

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

*Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису*

ЛУЧКОВА АЛІНА ЮРІЇВНА

УДК 546.221.1:576.311.347:612.172:546.41

**РОЛЬ СІРКОВОДНЮ У РЕГУЛЯЦІЇ КАЛЬЦІЄВОГО ГОМЕОСТАЗУ
ТА ФУНКЦІЙ МІТОХОНДРІЙ СЕРЦЯ ЩУРІВ В НОРМІ ТА ПРИ
СТАРІННІ**

Спеціальність 03.00.13 – фізіологія людини та тварин

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Лучкова А.Ю. _____

Науковий керівник: Сагач Вадим Федорович
чл.-кор. НАНУ, доктор медичних наук, професор

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Лучкова А.Ю. Роль сірководню (H_2S) у регуляції кальцієвого гомеостазу та функцій мітохондрій серця дорослих і старих щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13. – фізіологія людини і тварин. – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі сірководню (H_2S) як ендогенної регуляторної молекули у гомеостазі кальцію в мітохондріях серця дорослих і старих щурів. При застосуванні інгібітора мітохондріального ферменту синтезу H_2S знижувався його вміст у мітохондріях та плазмі крові. При цьому погіршувалися показники кардіодинаміки, зокрема тиск у лівому шлуночку, швидкість скорочення і розслаблення міокарда знижувалися вдвічі, а коронарний потік на 11,8 %. За умов кальцієвих навантажень серця дослідних тварин розвивали менш потужну реакцію, яка проявлялась у знижених значеннях Рлшл, скорочувальної активності, КП та ІСФ міокарда. Максимальна інотропна стимуляція серця у контрольних тварин спостерігалася у відповідь на додавання 7,5 ммоль/л $CaCl_2$, тоді як у дослідних щурів при 5 ммоль/л $CaCl_2$. Це свідчить про зниження функціональних резервів міокарда у тварин за умов пригнічення синтезу сірководню мітохондріальним ферментом. Також з'ясовано, що за умов пригнічення синтезу сірководню зростали показники окисного стресу, такі як супероксидний та гідроксильний радикали, відбувалося посилення перекисного окиснення ліпідів та збільшення активності iNOS, на тлі зменшення функціональної активності cNOS як в мітохондріях серця, так і в плазмі крові дослідних щурів. Вперше виявлено, що екзогенний сірководень (10^{-6} – 10^{-7} моль/л) підвищував вхід Ca^{2+} в мітохондрії серця дорослих та старих

щурів в умовах кальцієвого навантаження, при цьому 10^{-5} моль/л NaHS попереджав відкривання мітохондріальної пори в органелах, що свідчить про регуляцію сірководнем транспорту Ca^{2+} у мітохондріях та важливе фундаментальне значення цього відкриття. У той же час пригнічення ендogenous утворення H_2S *in vivo* знижувало поріг чутливості мітохондріальної пори до Ca^{2+} та підвищувало амплітуду набухання мітохондрій серця дорослих та старих щурів за дії інгібітора *in vitro*. В роботі вперше показано, що пригнічення мітохондріального ферменту синтезу сірководню *in vivo* знижувало функціональну здатність електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, яка проявлялась у зменшенні швидкості споживання кисню у станах V_2 , V_3 та V_4 , а також показників дихального контролю та АДФ/О за Чансом. Отже, ендogenous сірководень регулює транспорт кальцію в органелах, виконує антиоксидантну роль та підтримує роботу електронно-транспортного ланцюга в мітохондріях серця щурів різного віку.

Ключові слова: сірководень, Ca^{2+} , кальцієвий гомеостаз, мітохондріальна пора, дихальний ланцюг, мітохондрії, серце, щури, старіння.

SUMMARY

Luchkova A.Yu. The role of hydrogen sulfide (H_2S) in the regulation of calcium homeostasis and mitochondrial functions in adult and old rats. - Manuscript.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biological Sciences, speciality 03.00.13. - Human and animal physiology. – Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, 2020

The dissertation is devoted to the study of the role of hydrogen sulfide (H_2S) as an endogenous regulatory molecule of calcium homeostasis in the heart

mitochondria of adult and old rats. Using the inhibitor of mitochondrial H₂S synthesis enzyme decreased the H₂S content in mitochondria and blood plasma. At the same time cardiodynamic indexes, including left ventricle pressure and the rate of contraction and relaxation of the myocardium were reduced twice, and the coronary flow (CF) by 11.8%. Under conditions of calcium loading, the hearts of experimental animals developed weaker reaction, which was manifested in decreased values of LVP, contractile activity, CF and myocardial work. Maximum inotropic stimulation of the heart in control animals was observed in response to the addition of 7.5 mmol/l CaCl₂, whereas in the experimental - at 5 mmol/l CaCl₂. This indicates a decrease in myocardial functional reserves in animals under conditions of inhibition of the synthesis of hydrogen sulfide.

It was also found that under conditions of inhibition of hydrogen sulfide synthesis, oxidative stress indicators, such as superoxide and hydroxyl radicals increased as lipid peroxidation and activity of iNOS, against the decreased functional activity of cNOS in rat heart mitochondria. It was first discovered that exogenous hydrogen sulfide (10^{-6} - 10^{-7} mol/l) increases Ca²⁺ uptake into the mitochondria of adult and old rat heart under calcium loading, with 10^{-5} mol/l NaHS preventing mitochondrial pore opening in organelles. This demonstrates the regulation of Ca²⁺ transport in mitochondria by hydrogen sulfide and is the important fundamental discovery. At the same time, inhibition of endogenous H₂S formation *in vivo* reduces the threshold of sensitivity of the mitochondrial pore to Ca²⁺ and increases the swelling amplitude of adult and old rat heart mitochondria. It was shown for the first time that inhibition of the mitochondrial *in vivo* reduced the functional ability of the mitochondrial electron transport chain, which was manifested in the decrease of oxygen consumption rate in the states V₂, V₃ and V₄, as well as indicators of respiratory control and ADP/O. Therefore, endogenous hydrogen sulfide regulates

calcium transport in mitochondria, performs an antioxidant role and supports the work of the electron transport chain in mitochondria of the heart of rats of all ages.

Key words: hydrogen sulfide, Ca^{2+} , calcium homeostasis, mitochondrial pore, respiratory chain, mitochondria, heart, rats, aging.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ, В ЯКИХ
ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. **Будько А.Ю.**, Струтинська Н.А., Охай І.Ю., Семенихіна О.М., Сагач В.Ф. Накопичення Ca^{2+} у мітохондріях серця щурів за умов підтримання мітохондріального потенціалу. Фізіол. журн. 2015; 61(6): 17-25.
2. Струтинська Н.А., Коцюруба А.В., **Будько А.Ю.**, Мись Л.А., Сагач В.Ф. Порухення функціонування мітохондрій у серці при старінні супроводжується неспряженням конститутивних NO-синтаз на тлі оксидативного та нітрозативного стресу. Фізіол. журн. 2016; 62(2): 3-11.
3. **Лучкова А.Ю.**, Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Сірководень підвищує акумуляцію кальцію в мітохондріях та пригнічує відкриття циклоспорин А-чутливої мітохондріальної пори в серці щурів. Фізіол. журн. 2017; 63(3): 9-15.
4. **Лучкова А.Ю.**, Гошовська Ю.В., Федічкіна Р.А., Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Пригнічення мітохондріального шляху синтезу сірководню погіршує скоротливу функцію серця та підвищує чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у серці щурів. Фізіол. журн. 2017; 63(4): 3-9.
5. **Лучкова А.Ю.**, Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Вплив іонів кальцію на дихальний ланцюг мітохондрій у серці старих щурів. Фізіол. журн. 2018; 64(5):16-25.

6. **Лучкова А.Ю.**, Струтинська Н.А., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Інгібування мітохондріального синтезу сірководню посилює окисний стрес та погіршує роботу електронно-транспортного ланцюга. Фізіол. журн. 2018; 64(6):9-16.

ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Semenykhina O, Strutynska N., Chorna S., **Budko A.**, Dosenko V., Sagach V. NO-dependent prevention of mitochondrial permeability transition pore opening by hydrogen sulfide in old rat heart. FEBS J., 281 (Suppl. 1): 359 (2014).
2. **Alina Budko**, N.A. Strutynska, L.A. Mys, O.M. Semenykhina, V.F. Sagach Hydrogen sulfide (H₂S) regulates mitochondrial Ca²⁺ accumulation and prevents permeability transition pore opening in adult rat hearts. Conference for Young Scientists CYS-2015, September 21-25, Kyiv, Ukraine, Abstract book, p. 162.
3. **Budko AYu**, Strutynska NA, Mys LA, Sagach VF. NO-dependent prevention of permeability transition pore (MPTP) opening by H₂S and its regulation of Ca²⁺ accumulation in adult rat heart mitochondria. Cardiovascular Research Supplements. 2016; 111: S56-S81., Frontiers in cardiovascular biology, Florence, Italy, 08-10 July 2016.
4. **Лучкова А.Ю.**, Гошовська Ю.В., Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Інгібування мітохондріального шляху синтезу сірководню погіршує скоротливу функцію серця та підвищує чутливість мітохондріальної пори до Ca²⁺ у серці щурів. Бюлетень XVI читань ім. В.В. Підвисоцького, 18 – 19 травня 2017 року.

5. **A.Y. Luchkova**, L.A. Mys, Y.V. Goshovska, N.A. Strutynska, V.F. Sagach
The role of mitochondrial origin H₂S in mitochondrial permeability transition pore opening and cardiac resistance to Ca²⁺ overload in rats. 42-nd FEBS Congress from Molecules to Cells and Back. 10-14 September, 2017, Jerusalem, Israel
6. **Luchkova A.Yu.**, Strutynska N.A., Sagach V.F. Hydrogen sulfide (H₂S) regulates mitochondrial function, Ca²⁺ accumulation and mitochondrial permeability transition pore opening in old rat heart. European Heart Journal 39(suppl_1), August 2018. 25-29 August, 2018, Munich, Germany.
7. **Luchkova A**, Strutynska N, Sagach V. Hydrogen sulfide modulates calcium handling in cardiac mitochondria to maintain their function and helps heart to resist calcium overload. European Journal of Heart Failure, 21 (Suppl. S1), P. 577 Heart Failure 2019 & World Congress on Acute Heart Failure, Athens, Greece from 25 – 28 May 2019.

ЗМІСТ

		Стор.
АНОТАЦІЯ		2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ		11
ВСТУП		13
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ		20
1.1.	Роль іонів кальцію у функціонуванні серця	20
1.2.	Загальна характеристика мітохондрій та їх участь у кальцієвому гомеостазі клітин серця	22
1.3.	Структура функції та регуляція мітохондріальної пори перемінної проникності	30
1.4.	Функціонування мітохондрій за умов фізіологічного старіння	35
1.5.	Характеристика нових регуляторних молекул – газотрансмітерів	37
1.6.	Хімічні та біохімічні властивості сірководню (H ₂ S), його синтез та катаболізм	38
1.7.	Функції H ₂ S у серцево-судинній системі	43
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ		54
2.1.	Об'єкт дослідження	54
2.2.	Методика виділення мітохондрій та реєстрація відкриття мітохондріальної пори	54
2.2.1.	Виділення мітохондрій із серця щурів	54
2.2.2.	Визначення білка за Лоурі	55
2.2.3.	Реєстрація відкриття мітохондріальної пори	56

2.3.	Вивчення акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями	57
2.4.	Вивчення мембранного потенціалу виділених мітохондрій	58
2.5.	Реєстрація показників скоротливої функції ізольованого серця щурів	58
2.6.	Дослідження мітохондріального дихання за допомогою системи Oxуgraph+	61
2.7.	Визначення концентрації H ₂ S в мітохондріях щурів різних груп	63
2.8.	Біохімічні методи	64
2.9.	Статистична обробка експериментальних результатів	66
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ		67
3.1.	Вплив пригнічення мітохондріального шляху синтезу сірководню на скоротливу функцію серця та рівень окисного стресу	67
3.2.	Накопичення Ca ²⁺ у мітохондріях серця дорослих та старих щурів за умов підтримання мітохондріального потенціалу	75
3.2.1.	Акумуляція кальцію в ізольованих мітохондріях серця дорослих тварин	75
3.2.2.	Накопичення кальцію в ізольованих мітохондріях з тканини серця старих щурів	83
3.3.	Вплив сірководню на накопичення кальцію в ізольованих мітохондріях серця щурів	86

3.3.1.	Акумуляція Ca^{2+} мітохондріями під впливом донора сірководню NaHS	86
3.4.	Регуляція сірководнем відкриття мітохондріальної пори перемінної проникності	91
3.4.1.	Функціональні характеристики МП	91
3.4.2.	Вплив інгібування мітохондріального ферменту синтезу сірководню 3-MST <i>in vitro</i> на чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у серці щурів	93
3.4.3.	Вплив пригнічення <i>in vivo</i> мітохондріального ферменту синтезу сірководню на чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у серці щурів	96
3.5.	НО-залежна регуляція відкриття мітохондріальної пори сірководнем	98
3.6.	Регуляція сірководнем функцій мітохондрій дорослих та старих щурів	100
3.6.1.	Дослідження функціонального стану мітохондрій серця старих щурів	100
3.6.2.	Вплив пригнічення <i>in vivo</i> мітохондріального ферменту синтезу сірководню на функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій серця щурів	109
ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ		113
ВИСНОВКИ		120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		122
ДОДАТОК 1. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ		141

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АНТ	аденин нуклеотидтранслоказа
АТФ	аденозинтрифосфат
АФА	активні форми азоту
АФК	активні форми кисню
ГМ	гладенькі м'язи
ГМК	гладеньком'язова клітина
ДК	дієнові кон'югати
ІСФ	інтенсивність скоротливої функції
КДТ	кінцевий діастолічний тиск
КП	коронарний потік
МДА	малоновий диальдегід
МКУ	Мітохондріальний кальцієвий уніпортер
МП	мітохондріальна пора
ПД	потенціал дії
ПДГ	піруватдегідрогеназа
ПОЛ	перекисне окиснення ліпідів
ПФн	переносник неорганічного фосфору
ТЛШ	тиск, що розвиває лівий шлуночок
ЦТК	цикл трикарбонових кислот
Цф-Д	циклофілін Д
ЦсА	циклоспорин А
·ОН	гідроксильний радикал
Akt	протеїнкіназа В
VDAC	потенціалзалежний аніонний канал
CBS	цистатіонін-β-синтаза

CSE	цистатіонін- γ -ліаза
CAT	цистеїн аміотрансфераза
cNOS	конститутивна ізоформа синтази оксиду азоту
dP/dt_{max}	швидкість підвищення ТЛШ
dP/dt_{min}	швидкість зниження ТЛШ
iNOS	індуцибельна ізоформа синтази оксиду азоту
L-NAME	гідрохлорид N _{nitro} -нітро-L-аргінін метилового естеру
mtNOS	мітохондріальна ізоформа синтази оксиду азоту
NaHS	гідросульфід натрію
3-MPST	3-меркаптопіруват сульфуртрансфераза
$\Delta\psi_m$	мітохондріальний мембранний потенціал
H ₂ O ₂	пероксид водню
H ₂ S	сірководень
O ₂ ^{-•}	супероксидний радикал
ONOO ⁻	пероксинітрит
PKA	протеїнкіназа А
PKC	протеїнкіназа С
RyR1	мітохондріальні ріанодинові рецептори
SERCA	Ca ²⁺ АТФ-аза саркоплазматичного ретикулума

ВСТУП

Актуальність теми. Не зважаючи на інтенсивні дослідження та прогрес у лікуванні та попередженні серцево-судинних захворювань, смертність від них є на першому місці, і за даними ВООЗ, становить щорічно близько 17 млн осіб. Дослідження фізіологічних процесів та регуляторних молекул у серці, а також зміни за фізіологічного старіння залишаються актуальними і на сьогодні. Сірководень (H_2S) – це член родини газотрансмітерів, що ендогенно синтезується в організмі ссавців та виконує низку регуляторних функцій. У серцево-судинній системі H_2S діє як вазодилататор, активуючи K_{ATP} -залежні канали [1], проявляє антиоксидантні властивості через підвищення активності Mn- та Cu-супероксиддисмутаза, а також зниження вмісту активних форм кисню (АФК) в кардіоміоцитах під час ішемії-реперфузії [2]. H_2S стимулює ангиогенез, посилюючи експресію ростового фактора VEGF та активуючи фосфатидилінозитол-3-кіназу [3]. Він також активує ендотеліальну NO-синтазу (eNOS), відновлює спряження конститутивних NOS, попереджає апоптоз кардіоміоцитів, пригнічуючи індукцію каспази-3 та відкривання неспецифічного мегаканалу мітохондріальної пори (МП) [4] і регулює експресію міРНК [3]. Механізми дії сірководню різноманітні: відновлення SH-груп білків, дія через протеїнкіназу C та транскрипційний фактор Nrf2, взаємодія з різними типами іонних каналів, зокрема АТФ-залежними та кальційзалежними калієвими каналами [4], а також Ca^{2+} -каналами L- та T-типів [5]. Існує три ферменти синтезу сірководню: цистатіонін- β -синтаза (cystathionine β -synthase – CBS), цистатіонін- γ -ліаза (cystathionine γ -lyase – CSE) та 3-меркаптопіруват-сульфуртрансфераза (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase – 3-MPST), яка працює разом з цистеїнамінотрансферазою (cysteine aminotransferase – CAT). Ці ензими використовують амінокислоту L-

цистеїн як джерело HS-груп, а також характеризуються різним розподіленням в системах організму [6]. Раніше вважалося, що у серцево-судинній системі переважає CSE, експресія гена якого значно вища у тканинах серця та судин. Проте нещодавно показано, що важливу роль у коронарних артеріях відіграє сірководень, утворений ензимом 3-MPST [7]. До того ж відомо, що останній локалізується не лише в цитозолі клітин, а й в мітохондріях, що свідчить про фізіологічну роль сірководню в цих органелах. Щодо функцій H_2S в мітохондріях, відомо, що у високих концентраціях він пригнічує роботу IV комплексу дихального ланцюга, а у фізіологічних – може бути неорганічним донором електронів для електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) [8]. Ендогенний H_2S , що виробляється мітохондріально локалізованим 3-MPST, підтримує базальні, фізіологічні клітинні, біоенергетичні функції, при цьому активність цієї метаболічної підтримки знижується з фізіологічним старінням [8]. За деяких умов, зокрема при перевантаженні клітин гладеньких м'язів судин кальцієм, у ракових клітинах товстого кишечника, CSE та CBS також можуть асоціюватися з мітохондріями, а H_2S , що виробляється цими ферментами, слугує ендогенним стимулятором клітинної біоенергетики [8]. Проте мало відомо про регуляцію сірководнем кальцієвого гомеостазу у мітохондріях клітин серця, а він є важливим фактором нормального функціонування органел і організму в цілому. Відомо, що акумулювання кальцію в мітохондріях відіграє ключову роль в регуляції багатьох функцій клітин, починаючи від синтезу АТФ до загибелі клітин шляхом апоптозу [9, 10]. Збільшення концентрації мітохондріального Ca^{2+} активує дегідрогенази і транспортери, призводячи до підвищення частоти мітохондріального дихання та екструзії протонів, результатом чого є утворення необхідної кількості АТФ для стабілізації енергетичного стану клітини. Однак тривале підвищення його вмісту в цих органелах призводить до відкриття МП, що є критичною

подією у розвитку апоптозу і загибелі клітин. Відомо також, що за фізіологічного старіння вхід кальцію в органели підвищується [11], а МП стає більш чутливою до нього і може легше переходити в стан високої провідності [12]. Також при старінні знано підвищується вміст вільних радикалів в клітинах. Оскільки кількість людей старшого віку у світі невинно зростає, нам було цікаво провести дослідження по вивченню регуляції сірководнем гомеостазу кальцію в мітохондріях паралельно на двох моделях: дорослих і старих тваринах. Таким чином, у роботі досліджували регуляцію сірководнем кальцієвого обміну у мітохондріях, а також його вплив на функції ЕТЛ органел серця щурів різного віку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в межах наукової тематики відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення впливу сірководню на діяльність серця, судинний тонус і функціональний стан мітохондрій», 2010-2013рр. (№ держреєстрації 0107U005336) та «Дослідження ролі сигнальних сполук сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму», 2014-2018рр. (№ держреєстрації 0113U007276).

Мета і завдання дослідження: дослідити роль сірководню у регуляції кальцієвого гомеостазу та функцій мітохондрій серця дорослих та старих щурів.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Дослідити вплив блокади мітохондріального ферменту 3-MPST на функціональний стан і реакції серця.
2. Дослідити вплив пригнічення мітохондріального шляху синтезу сірководню на показники окисного стресу такі як $\cdot\text{O}$ та $\cdot\text{OH}$ радикали, активність перекисного окиснення ліпідів та активність iNOS та cNOS як в мітохондріях серця, так і в плазмі крові дослідних щурів.

3. Виявити вплив екзогенного та ендогенного сірководню на накопичення кальцію мітохондріями серця дорослих та старих щурів.
4. Дослідити вплив інгібування ендогенного сірководню на чутливість МП до Ca^{2+} у дорослих та старих щурів.
5. Вивчити вплив пригнічення мітохондріального синтезу сірководню на функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій серця щурів.

Об'єкт дослідження: кальцієвий гомеостаз в мітохондріях серця щурів різного віку.

Предмет дослідження: роль сірководню та вплив ендогенного H_2S на функціонування мітохондрій серця дорослих і старих щурів.

Методи дослідження: виділення мітохондрій методом диференційного центрифугування; вивчення накопичення кальцію у мітохондріях з використанням флуоресцентного кальційчутливого барвника Fluo-4 AM та проточного цитофлуориметра; дослідження відкриття мітохондріальної пори за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання органел серця за наявності індукторів; полярографічне дослідження дихання мітохондрій серця щурів з використанням приладу OxuGraph+; перфузія коронарних судин ізольованого серця щурів за методом Лангендорфа та реєстрація скоротливої активності лівого шлуночка в умовах кальцієвих навантажень; дослідження показників оксидативного та нітрозативного стресу а також вмісту сірководню, з використанням біохімічних методів.

Наукова новизна отриманих результатів. Отримано нові результати щодо регуляції сірководнем кальцієвого гомеостазу мітохондрій серця щурів. Вперше показано, що інгібування ферменту синтезу H_2S 3-MPST, який знаходиться, переважно в мітохондріях, призводило до порушення роботи серця, зниження показників кардіодинаміки, зокрема тиску в лівому шлуночку, швидкості скорочення та розслаблення, а також інтенсивності

скоротливої функції. При цьому серця дослідних тварин не витримували кальцієвих навантажень. Також з'ясовано, що за умов пригнічення синтезу сірководню зростали показники окисного стресу, такі як супероксидний та гідроксильний радикали, відбувалося посилення перекисного окиснення ліпідів та збільшення активності iNOS, на тлі зменшення функціональної активності sNOS як в мітохондріях серця, так і в плазмі крові дослідних щурів. Вперше виявлено, що екзогенний сірководень (10^{-6} – 10^{-7} моль/л) підвищує вхід Ca^{2+} в мітохондрії серця дорослих та старих щурів в умовах кальцієвого навантаження, при цьому екзогенний сірководень (10^{-5} моль/л NaHS) попереджає відкривання мітохондріальної пори в органелах серця дорослих та старих щурів, що свідчить про регуляцію сірководнем транспорту Ca^{2+} у мітохондріях та важливе фундаментальне значення цього відкриття. У той же час пригнічення ендогенного утворення H_2S *in vivo* знижувало поріг чутливості мітохондріальної пори до Ca^{2+} та підвищувало амплітуду набухання мітохондрій серця дорослих та старих щурів за дії інгібітора *in vitro*. Нами вперше показано, що пригнічення мітохондріального ферменту синтезу сірководню *in vivo* знижувало функціональну здатність електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, яка проявлялась у зменшенні швидкості споживання кисню у станах V_2 , V_3 та V_4 , а також показників дихального контролю та АДФ/О за Чансом.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Отримані в роботі результати мають фундаментальний характер, оскільки розкривають нові механізми дії сірководню у мітохондріях серця щурів і виявляють важливість сірководню, синтезованого у мітохондріях, для нормального функціонування серця. Результати доповнюють існуючі відомості про властивості H_2S як регуляторної молекули та підтверджують необхідність його утворення в мітохондріях. Можуть бути використані при

підготовці лекцій чи спеціалізованих курсів з клітинного сигналювання чи регуляції функціонування серцево-судинної системи регуляторними молекулами та газотрансмітерами зокрема.

Особистий внесок здобувача.

Автором особисто проаналізовано наукову літературу по темі дослідження та у співпраці з науковим керівником чл.-кором НАНУ, д.м.н., професором Сагачем В.Ф. сформульовано мету та завдання роботи. Самостійно проведено дослідження з вивчення акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями, набухання органел за дії донора та інгібітора синтезу сірководню *in vivo*, вивчення показників мітохондріального дихання. Частина дослідження проведена за участі співробітників відділу фізіології кровообігу, зокрема вивчення біохімічних показників окисного стресу з допомогою н.с., к.б.н. Коркач Ю.П., та ст.н.сп., к.б.н. Струтинської Н.А., вивчення показників роботи серця за методом Лангендорфа з допомогою н.с., к.б.н. Гошовської та м.н.с. Добровольської, а також Охай І.Ю. Дисертантом особисто проведено аналіз всього обсягу експериментальних даних, їх узагальнення і написання статей, а також представлення результатів на наукових конференціях та з'їздах.

Апробація результатів дисертації. Основні положення й результати дисертації були представлені та обговорені на конференціях та конгресах: Conference for Young Scientists CYS-2015, September 21-25, Kyiv, Ukraine (усна доповідь); Frontiers in cardiovascular biology, Florence, Italy, 08-10 July 2016 (постерна доповідь); XVI читання ім. В.В. Підвисоцького, Одеса, 18-19 травня 2017 року; IV Международная научно-практическая конференция «Наука и медицина: современный взгляд молодежи», 20-21 апреля 2017 г., г. Алматы, Казахстан; 42-nd FEBS Congress from Molecules to Cells and Back, 10-14 September, 2017, Jerusalem, Israel (постерна доповідь); ESC Congress 25-29

August, 2018, Munich, Germany (модерована постерна доповідь); Heart Failure 2019 & World Congress on Acute Heart Failure, Athens, Greece from 25 – 28 May 2019 (постерна доповідь); Basic science summer school, organized by ESC, 16-20 June 2019, Nice, France (постерна доповідь).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, у тому числі 6 статей у фахових наукових журналах, рекомендованих ДАК України, 7 – у тезах конгресів, з'їздів, конференцій.

Структура і об'єм дисертації. Дисертація складається зі списку скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, заключного розділу і списку використаної літератури з 176 найменувань. Роботу викладено на 140 сторінці та ілюстровано 30 рисунками і 2 таблицями.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль йонів кальцію у функціонуванні серця

Кальцій є центральною сигнальною молекулою, яка регулює спряження процесу збудження-скорочення, тобто перетворення електричних стимулів у механічну відповідь серця. Скорочення серцевого м'яза відбувається за такими самими механізмами, як і скорочення скелетної мускулатури. Пейсмекерні клітини синоатріального та атріовентрикулярного вузлів індукують потенціал дії (ПД), який проводиться до скоротливих кардіоміоцитів через міжклітинні контакти – десмосоми. Рухаючись між саркомерами, ПД активує потенціалзалежні кальцієві канали L-типу, що призводить до входу іонів Ca^{2+} з позаклітинного простору в кардіоміоцити, та, в свою чергу, активує ріанодинові рецептори 2 типу (RyR type 2) для вивільнення кальцію із саркоплазматичного ретикулума. Внаслідок такого кальційіндукованого вивільнення кальцію (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} released, CICR) його концентрація в цитоплазмі зростає у 100 разів [13]. Подальше зв'язування Ca^{2+} з серцевим тропоніном С призводить до зміни конформації цього білка і звільняє сайти актину для приєднання до них міозину. Головки останнього, використовуючи енергію аденозинтрифосфату (АТФ), штовхають актинові філаменти в напрямку центру саркомера, скорочуючи серцевий м'яз. Сила скорочення залежить від кількості Ca^{2+} , зв'язаного з тропоніном та тривалості зростання його внутрішньоклітинної концентрації, а також від сили його зв'язування, що у свою чергу контролюється фосфорилуванням кальцієвих pomp та іонних каналів. Основними регуляторними ферментами є протеїнкінази А та С (РКА, РКС), а також Ca^{2+} /кальмодулін залежна протеїнкіназа (CaMKII) [14].

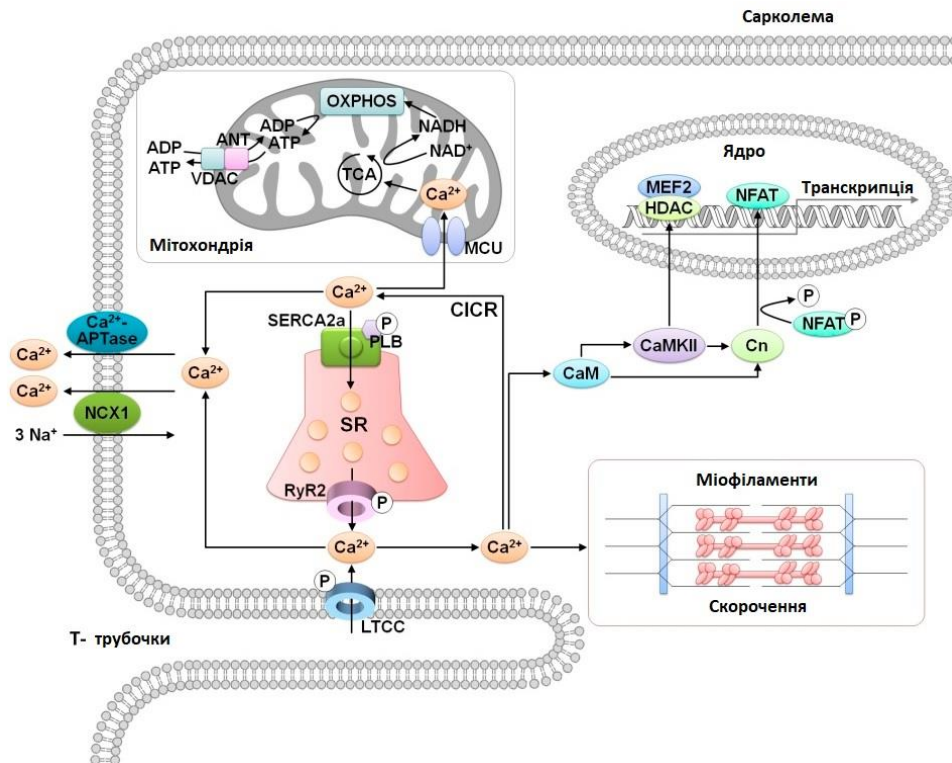


Рис. 1.1. Схематичне зображення залучення іонів кальцію у спряження процесу збудження-скорочення [15].

Процес збудження-скорочення залежить не лише від комбінації властивостей кальцієвих каналів і транспортерів, але й від їхньої точної локалізації та просторового розміщення. Відомо, що важливу роль в цьому відіграють t-трубочки плазматичної мембрани, які забезпечують близьке розташування ріанодинових рецепторів саркоплазматичного ретикулу та кальцієвих каналів L-типу у плазмалемі (простір між ними має складати 15 нм). У такому разі утворюється серцева діада, яка є фундаментальною для процесу ініціації систолічного кальцієвого переходу та скорочення [14].

У стані спокою в цитоплазмі кардіоміоцитів концентрація кальцію становить близько 100 нмоль/л, а під час систоли вона зростає до 1 мкмоль/л. Проте кальцій в цитоплазмі відразу ж забуферюється. На кожний іон вільного

кальцію близько 100-200 іонів зв'язується з буфером. Це означає, що загальне підвищення цитоплазматичного Ca^{2+} сягає 100-200 мкмоль/л. Основними ж кальцієвими буферами в клітинах є тропонін та кальцієва АТФ-аза саркоплазматичного ретикулума (SERCA) [14, 16].

Отже, головним фактором, який регулює скорочення, є концентрація внутрішньоклітинного кальцію. У стаціонарному стані під час кожного серцевого циклу, кількість кальцію, яка надходить в клітину, має дорівнювати тій, що виходить з клітини. Дисбаланс між входом і виходом кальцію виникає тимчасово, а потім призводить до зміни амплітуди кальцієвого транз'єнту та скорочення [14].

Розслаблення виникає за умов зниження концентрації катіона в цитозолі в результаті роботи вищезгаданої помпи SERCA, Ca^{2+} -АТФази сарколеми, Na^+ - Ca^{2+} -обмінника та внаслідок акумуляції Ca^{2+} у мітохондріях [17]. При цьому тропоніновий комплекс набуває положення, за якого активні сайти актину закриті для зв'язування з міозином, тому м'яз розслабляється. Мітохондрії не лише відіграють роль депо Ca^{2+} , а й потребують його для фізіологічного функціонування, зокрема для активації окисного фосфорилування та синтезу АТФ через стимуляцію дегідрогеназ циклу трикарбонових кислот (ЦТК) [9].

1.2. Загальна характеристика мітохондрій та їх участь у кальцієвому гомеостазі клітин серця

Мітохондрії є надзвичайно важливими внутрішньоклітинними структурами, які визначають долю клітин ссавців у нормі та при патології. Результати досліджень показують, що ці органели чутливі до патологічних впливів, які часто зумовлені порушеннями внутрішньоклітинного балансу кальцію [18].

Мітохондрії – субклітинні органели – є важливими регуляторами життя та смерті клітини, оскільки відповідають на велику кількість сигналів, включаючи окисний стрес, пошкодження ДНК та гіпоксію, а також виконують основну функцію для підтримання життєдіяльності – генерують АТФ [19, 20]. У кардіоміоцитах мітохондрії займають 30 % об'єму клітини і продукують 90 % енергії у вигляді АТФ, необхідної для роботи серцевого м'язу [20]. Під час окисного фосфорилування мітохондрія встановлює мембранний потенціал через перекачування протонів з матриксу у міжмембранний простір, що є рушійною силою для роботи АТФ-синтази [19].

У цих органелах відбуваються такі важливі процеси, як ЦТК, окисне фосфорилування, в процесі якого генерується енергія АТФ і окиснюються НАДН, ФАДН₂, окиснення жирних кислот, чотири необхідні ензими для якого, локалізуються в матриксі мітохондрій. Мітохондрії залучені не лише до енергетичних процесів клітини, але й до таких важливих метаболічних реакцій, як цикл сечовини, біосинтез гема, регуляція іонів Ca²⁺ і P⁺ в клітині, синтез ліпідів та амінокислот тощо [21]. Дуже важливою є участь мітохондрій в апоптозі – запрограмованій клітинній смерті, оскільки вони є місцем зберігання апоптогенних факторів (білки родини BCL-2), відповідають за вивільнення цитохрому c і протеїнів, які індукують апоптоз, відповідають за вихід протеїнів, що нейтралізують ендогенні інгібітори апоптозу (SMAC/DIABLO), синтезують АТФ, який необхідний для проходження процесу [21]. Зважаючи на вищезазначені функції, роль мітохондрій в клітині важко переоцінити, а порушення функціонування цих органел призводить до розвитку різних захворювань, в тому числі серцевої недостатності при старінні, артеріальної гіпертензії тощо.

Феномен акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями було відкрито на початку 70-х років ХХ ст, коли показали зниження концентрації катіона у

суспензії ізольованих енергізованих органел [22]. Згодом виявили мітохондріальний кальцієвий уніпортер (МКУ) – трансмембранний протеїн, продукт гена *ccdc109a*, через який відбувається вхід Ca^{2+} в мітохондрії [23, 24]. Спочатку органели вважали лише пасивними депо для катіона, адже отримані результати 1994 року свідчили про низьку спорідненість МКУ до Ca^{2+} , що дало підґрунтя так вважати. Проте розвиток Ca^{2+} -чутливих сенсорів дав змогу дослідити активну участь мітохондрій у гомеостазі клітинного кальцію [22].

Відомо, що мітохондрії депонують кальцій на додачу до багатьох цитоплазматичних кальційзв'язувальних протеїнів. Проте, на відміну від білків, вони можуть захоплювати його у великих кількостях та здатні працювати як динамічні резервуари. Мітохондріальна кальцієва ємність залежить від енергетичного статусу та типу клітин [25]. Наприклад, вхід мітохондріального кальцію з певних субплазмалемальних доменів знижує інактивацію каналів SOCE (store-operated Ca^{2+} -entry), а у мітохондріях нейронів акумуляція кальцію в синапсах модулює місцеву динаміку кальцію, що впливає на вивільнення нейротрансмітерів [26]. Також поглинання кальцію мітохондріями із субклітинних доменів модулює функцію інших каналів, таких як інозитол трифосфатний рецептор (IP3R), RyR у ендоплазматичному ретикулумі та кальцієвих каналів L-типу, що знаходяться у плазматичній мембрані [27].

Ca^{2+} – активатор мітохондріального метаболізму

Матриксний кальцій модулює активність багатьох мітохондріальних протеїнів, які у свою чергу пришвидшують окисний метаболізм та синтез АТФ. Зокрема підвищується активність піруватдегідрогенази (ПДГ), в результаті зв'язування піруватфосфатази з кальцієм, дефосфорилування та підвищення активності власне ПДГ комплексу. При цьому швидкість проходження ЦТК та синтез АТФ підвищуються [28, 29]. Активація α -

кетоглутаратдегідрогенази відбувається через пряме зв'язуванням вільного кальцію з субодиницею E1 [28, 30]. Інший кальційзалежний фермент ізоцитратдегідрогеназа, який каталізує декарбоксілювання ізоцитрату до альфа-кетоглутарату в третій реакції ЦТК має низьку чутливість до кальцію, тому потребує вищої концентрації катіона в матриксі для регуляції своєї активності [30]. Вільний матриксний кальцій також регулює активність АТФ-синтази, модулюючи її посттрансляційну модифікацію (фосфорилування) та через Ca^{2+} -залежне зв'язування протеїну S100A1 з субодиницею F1, що підвищує синтез АТФ [31, 32].

До інших мітохондріальних протеїнів, регулятором для яких є Ca^{2+} належить FAD-гліцерол 3-фосфатдегідрогеназа [33], цитохром-с-оксидаза [34], NO синтаза, цитрин, аралар 1, малат-аспартатний шатл [35], АТФ- $\text{Mg}^{2+}/\text{P}_i$ транспортер [33] та β -гідроксибутиратдегідрогеназа. Кальцій модулює активність цих протеїнів в матриксі мітохондрій або ж у цитозолі опосередковано через посттрансляційні модифікації чи пряму взаємодію зі специфічними кальційзв'язувальними доменами [29].

Транспортування іонів кальцію в мітохондріях

Вхід кальцію через зовнішню мембрану мітохондрій відбувається через потенціалзалежний аніонний канал (voltage dependent anion channel, VDAC), який характеризується високою провідністю та низькою іонною селективністю. Проте відомо, що VDAC бере участь у регуляції проникнення кальцію в органели, оскільки за його надекспресії спостерігається посилене захоплення Ca^{2+} мітохондріями [36].

Вхід кальцію через внутрішню мембрану мітохондрій здійснюється, головним чином, через МКУ, робота якого залежить від мембранного потенціалу мітохондрій, що у нормі становить -180 мВ [17]. Окрім МКУ до структур, які відповідають за вхід кальцію в мітохондрії, належать такі

протеїни як MICU1 (mitochondrial Ca uptake 1), роз'єднувальні мітохондріальні білки UCP2, UCP3, мітохондріальні р'іанодинові рецептори (RyR1), швидкий режим поглинання кальцію (rapid mode of calcium uptake, RaM), mCa 1 і 2, коензим Q10, протеїн TRPC3 (canonical transient receptor potential 3 channel, TRPC3) та трансмембранний протеїн LETM1 (leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1) [36, 37]. Основними компонентами МКУ нині вважають власне білок МКУ, протеїн МКУб, природний регулятор МКУ EMRE (essential MCU regulator) і мембранасоційовані регуляторні субодиниці у внутрішньомембранному просторі (MICU1-3) [36].

Нині вважається, що МКУ – це мультипротеїновий комплекс, основним компонентом якого є білок – продукт гена CCDC109A, висококонсервативний протеїн еукаріот масою 40 кДа. МКУ формує пору як гомоолігомер і має пентамеричну стехіометрію. Надекспресія МКУ посилює вхід кальцію у матрикс мітохондрій в інтактних та пермеабілізованих органелах, а нокдаун значно знижує цей процес. Нокаут гена МКУ зупиняє вхід кальцію в органели, що підтверджує головну роль протеїну у процесі входу кальцію в органели [36].

Існує МКУб – паралог гена МКУ, раніше відомий як CCDC109B. Його продуктом є протеїн масою 33 кДа, який на 50 % подібний до МКУ за амінокислотою послідовністю [38]. Наявність обох паралогів в ліпідному бішарі значно знижує ймовірність відкриття МКУ, а надекспресія МКУб в інтактних клітинах знижує вхід кальцію в мітохондрії, що вказує на те, що МКУб – це ендогенна домінантно-негативна субодиниця пори уніпортера. MICU1 – це протеїн масою 54 кДа, що містить два консервативні кальційзв'язувальні домени. Відомо, що це мембранасоційований білок у міжмембранному просторі мітохондрій. Вважається, що MICU1 є воротарем

уніпортера, регулює його відкривання та утримує закритим у стані спокою, а також активує за високих концентрацій кальцію [39].

До компонентів МКУ також належить білок EMRE масою 10 кДа, який містить один трансмембранний домен і висококонсервативну багату на аспартат С-кінцеву ділянку [40]. Важливо те, що нокдаун або нокаут гена EMRE повністю пригнічує вхід кальцію в мітохондрії, що свідчить про важливу регуляторну роль протеїну у функціонуванні уніпортера. EMRE взаємодіє з МКУ у внутрішній мембрані, а MICU1 – у міжмембранному просторі [36]. Регуляторний протеїн MCUR1 (mitochondrial Ca²⁺ uniporter regulator 1) – продукт гена CCDC90A. Це протеїн масою 40 кДа, який складається з двох трансмембранних доменів і однієї спіральної ділянки. Нокдаун цього регуляторного білка не лише інгібує вхід кальцію в мітохондрії, а також знижує базальний вміст катіона в матриксі органел. Надекспресія MCUR1 підвищує вхід кальцію лише за умов наявності білка МКУ, що вказує на його регуляторну функцію, яка необхідна для роботи комплексу [36].

Окрім комплексу МКУ існують інші механізми входу кальцію в мітохондрії. На ізольованих органелах печінки описано швидкий режим поглинання кальцію RaM, який активується тимчасово і забезпечує швидке захоплення катіона на початку кожного підвищення його концентрації в цитозолі. Вхід кальцію цим шляхом відбувається в 300 разів швидше ніж через уніпортер, проте відновлення RaM після роботи потребує більше 60 секунд. Подібно до уніпортера RaM інгібується рутенієм червоним, проте вищими концентраціями ніж при інгібуванні МКУ. Активаторами RaM є поліаміни, зокрема спермін [17, 36]. АТФ та ГТФ активують RaM в печінці, тоді як в серці його активатором є АДФ, а інгібітором – АМФ.

Мітохондріальні RyR1 розміщуються у внутрішній мембрані органел і є альтернативним механізмом захоплення кальцію в нервових та серцевих

клітинах. Ріанодинові рецептори – це найбільші з відомих іонних каналів, розміром більше ніж 2 MDa. Існує три різні ізоформи каналів (RyR1, RyR2 та RyR3) з різними фармакологічними властивостями і тканинно-специфічною експресією. У скелетних м'язах основною ізоформою рецепторів у саркоплазматичному ретикулумі є RyR1, тоді як у серцево-судинній системі переважає RyR2. Третій тип рецепторів розповсюджений в ендоплазматичному ретикулумі інших тканин. У серцевій тканині RyR2 локалізуються в саркоплазматичному ретикулумі, а RyR1 у мітохондріях. Для мітохондріальних RyR характерні такі ж біохімічні, фармакологічні та функціональні властивості, як і для ріанодинових рецепторів скелетних м'язів. Активація мітохондріальних RyR відбувається після зв'язування ріанодину, має куполоподібну залежність від кальцію і спостерігається за умов, коли концентрація кальцію сягає від 100 нмоль/л до 10 мкмоль/л. Повне інгібування ріанодинових рецепторів відбувається, коли концентрація кальцію сягає значень 0,1-1 ммоль/л. Також ріанодинові рецептори інгібуються іонами Mg^{2+} і рутенієм червоним.

mCa1 і mCa2 – потенціалзалежні кальційселективні канали подібні до МКУ з максимальною провідністю 10,9 і 6,56 пС відповідно за концентрації кальцію 105 ммоль/л. Так як і МКУ та RaM, ці два канали активуються сперміном. Нині не з'ясовано чи це окремі структури, чи частини МКУ [41].

Також було показано, що коензим Q10 (убіхінон) – природний компонент мітохондріального електронно-транспортного ланцюга – є регулятором кальцієвого та окисно-відновного гомеостазу в мітохондріях. За фізіологічних умов гідроксил коензиму Q може зв'язувати і ефективно транспортувати кальцій. Відновлений убіхінон має високу афінність до кальцію і може працювати за концентрації катіона нижчої ніж 0,5 мкмоль/л [42]. Цей відносно повільний шлях входу кальцію може підтримувати його

малу постійну концентрацію в матриксі органел навіть при нокауті МКУ в мітохондріях серця.

Спочатку вважалося, що трансмембранний протеїн LETM 1 – це K^+/H^+ -обмінник, хоча зараз встановлено, що це Ca^{2+}/H^+ -антипортер, локалізований у внутрішній мембрані мітохондрій. Показано, що він транспортує кальцій у двох напрямках через внутрішню мембрану, рН-залежним способом та інгібується рутенієм червоним [43]. Проте нещодавні дослідження показали, що LETM 1 електронейтральний $1 Ca^{2+}/2 H^+$ антипортер, не чутливий до рутенію червоного [44].

Окрім зазначених «класичних» шляхів входу Ca^{2+} в мітохондрії, відомо про альтернативний механізм за допомогою TRPC3 (transient receptor potential channel 3) каналу [45]. Він проникний для Ca^{2+} , Na^+ і K^+ і бере участь у вході кальцію за умов його високої концентрації в цитозолі.

Вихід кальцію з матриксу мітохондрій відбувається за Na^+ -залежним та Na^+ -незалежними механізмами. При цьому в клітинах серця вивільнення Ca^{2+} з органел здійснюється, головним чином, через Na^+/Ca^{2+} -обмінник, тоді як H^+/Ca^{2+} -обмінник відіграє незначну роль [17]. Na^+/Ca^{2+} -антипортер використовує міжмембранний градієнт натрію і є чутливим до його фізіологічних флуктуацій у цитозолі. За нормальних умов зміни концентрації йонів натрію в цитозолі є незначними, проте у разі серцевої недостатності та інших патологічних станів, вміст внутрішньоклітинного Na^+ може значно змінюватися. Na^+/Ca^{2+} -обмінник відіграє важливу роль у модуляції балансу між зовнішньо- та внутрішньомітохондріальним кальцієм. Перевантаження клітини кальцієм, яке спостерігається за серцевої недостатності, порушує цю рівновагу, спричиняючи зміни окисно-відновного потенціалу піридинових нуклеотидів і призводить до підвищення кількості утворення АФК, що в кінцевому результаті призводить до шкідливого впливу на мітохондріальну

біоенергетику та невідповідності у потребі та синтезі АТФ. Натрійзалежне вивільнення кальцію інгібується двовалентними катіонами і низкою хімічних речовин, включаючи блокатори Ca^{2+} -каналів (ділтіазем, верапаміл) та похідні бензодіазепіну. Крім того, залишається суперечливим питання чи є $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник електронейтральним чи електрогенним. Вважається, що він електрогенний, оскільки обмінює 3 іона Na^+ на один Ca^{2+} . При цьому екструзія Ca^{2+} буде призводити до деполяризації мітохондріальної мембрани, зменшуючи таким чином вхід кальцію в матрикс. Для підтримання необхідної концентрації натрію в матриксі, на внутрішній мембрані мітохондрій також знаходиться Na^+/H^+ -обмінник, який викачує іони Na^+ з мітохондрій [17].

Окрім вищезазначених транспортерів кальцію, до системи вивільнення катіона належить також мітохондріальна пора перемінної проникності (МП) – складний мультипротеїновий комплекс, розміщений між зовнішньою та внутрішньою мембранами.

1.3. Структура функції та регуляція мітохондріальної пори перемінної проникності

Історія відкриття та моделі будови мітохондріальної пори. Явище зміни проникності внутрішньої мембрани мітохондрій для речовин, масою до 1500 Да, яке пригнічується аденіловими нуклеотидами, відоме з 50-х років ХХ ст. Термін вперше був вжитий дослідниками Хавортом і Хантером у 1979 році, які описали основні характеристики цього процесу в мітохондріях серця і виявили, що підвищення проникності мітохондріальних мембран відбувається внаслідок відкриття МП у внутрішній мембрані органел [10]. Пізніше цю гіпотезу було підтверджено петч-клемпом мітопластів, і показано утворення неселективного високопровідного каналу [46]. Відтоді почалося активне дослідження ролі МП за фізіологічних та патологічних умов і показано, що

речовини, які інгібують відкривання МП, є потенційними терапевтичними препаратами для лікування ішемічної хвороби серця, серцевих нападів та інших захворювань серцево-судинної системи [47, 48]. Відкривання МП вже традиційно пов'язують з дисфункцією мітохондрій, тому що воно призводить до деполяризації мембран, припинення синтезу АТФ, вивільнення кальцію, зменшення вмісту піридинових нуклеотидів, інгібування дихання і набухання мітохондрій. Надалі таке набухання призводить до виходу цитохрому *c*, пошкодження зовнішньої мембрани мітохондрій і, зрештою, вивільнення проапоптичних білків, таких як цитохром *c*, ендонуклеаза *G*, апоптоз-індукуючого фактора (apoptosis inducing factor, AIF) тощо. Слід зазначити, що ці негативні наслідки спостерігаються лише при довготривалій індукції МП, тоді як транзиторне відкривання має фізіологічну функцію для регуляції гомеостазу кальцію та АФК [46].

У перших роботах по дослідженню МП було показано, що ця структура виконує важливу роль у підтриманні внутрішньоклітинного Ca^{2+} гомеостазу [49]. Так, з'ясовано, що канал може перебувати у двох станах: низькопровідному (low-conductance state) та високопровідному (high-conductance state) [49], при цьому у першому стані пора проникна для молекул з молекулярною масою нижче 300 Да, і таких іонів, як H^+ , Ca^{2+} , K^+ [47, 50]. За допомогою методу петч-клемп досліджено, що *in vitro* та *in situ* МП “пульсує”, що дало змогу припустити, існування низькопровідної “мерехтливої” пори, яка попереджає перевантаження мітохондрій кальцієм [49]. Природні та фармакологічні активатори МП зумовлюють перехід пори у високопровідний стан, що спричиняє вхід в мітохондрії молекул масою до 1,5 кДа, разом з якими до органел надходить вода, що призводить до набухання їх матриксу. В результаті індукції МП з мітохондрій вивільняється цитохром *c*, що є

основним пусковим механізмом розвитку апоптозу. Якщо ж у клітині недостатній вміст АТФ, розвивається некроз [51].

Молекулярна природа МП була суперечливим питанням протягом останніх 30 років. Спочатку вважали, що МП знаходиться на контактних сайтах (місця наближення зовнішньої та внутрішньої мембран) і утворена потенціал залежним аніонним каналом (voltage dependent anion channel, VDAC) в зовнішній мембрані та аденіл нуклеотид транслоказою (adenine nucleotide translocator, ANT) – у внутрішній, а також циклофіліном Д (cyclophilin D, Cys D), який локалізується у матриксі мітохондрій [52]. Проте низкою генетичних досліджень з використанням нокауту генів було показано, що VDAC, ANT та Cys D не є пороформуючими одиницями. Сьогодні запропоновано нову гіпотезу, за якої до складу МП входить переносник фосфатів (Phosphate carrier, PiC), F_0F_1 АТФ-синтаза, а також за недавніми відомостями, металопротеїназа SPG7, як основний пороутворювальний компонент [52].

Було показано, що пора активується високими концентраціями матричного кальцію, фосфатами і АФК, а інгібується такими факторами як аденілові нуклеотиди, низький рН, дивалентні катіони, наприклад Mg^{2+} та інгібіторами Cys D, а саме циклоспорином А та сангліферином А [53]. Активація МП може здійснюватися також кіназами, та посттрансляційною модифікацією циклофіліну Д [53]. Як зазначалося вище, за ішемічної хвороби серця спостерігається збільшення вмісту активаторів МП, таких як Ca^{2+} АФК, і зниження кількості інгібіторів, таких як АТФ/АДФ. Хоча біофізичні властивості МП добре встановлені, ідентифікація її молекулярних складових виявилася науковою проблемою, яка залишається невирішеною [54].

Виявити молекулярну будову МП важливо для того, щоб знати на які компоненти діяти фармакологічно. Спочатку вважали, що в зовнішній

мембрані мітохондрій МП формує VDAC, також відомий, як порин, оскільки він є найпоширенішим протеїном зовнішньої мітохондріальної мембрани, сприяє ефективному транспорту АТФ/АДФ через мембрану та функціонує як неселективна пора до аніонів та катіонів [55]. Проте сучасні генетичні дослідження показали, що втрата всіх трьох ізоформ VDAC не змінює проникності мітохондріальних мембран і не має захисного ефекту. Це доводить факт, що VDAC не є обов'язковим компонентом МП [54]. ANT – це транспортер у внутрішній мембрані мітохондрій масою 32 кДа, відповідальний за імпорту АДФ в матрикс, а АТФ назовні. Вважалося, що ANT є компонентом пори, оскільки він прямо зв'язується з Cys D, а безпосередній інгібітор ANT бонгкрекова кислота пригнічує утворення МП. В той же час, інший прямиий інгібітор ANT, а саме атрактилозид, ініціює відкриття мітохондріальної пори. З'ясування причини цього явища показало, що ці два інгібітори ANT по-різному зв'язуються з нею, фіксуючи ANT у різних конформаціях: бонгкрекова кислота приєднується до протеїну з боку матриксу (m – матрична конформація), тоді як атрактилозид зв'язується з ANT зі сторони цитозолу (c – цитозольна) [54, 56]. Подальшими дослідженнями виявили, що ANT, скоріше за все, працює як регуляторний протеїн, впливає на чутливість МП до аденінових нуклеотидів, лігандів до ANT і Ca^{2+} [57]. Cys D – мітохондріальна матриксна петидил-проліл цис-трансизомераза, що має масу 18 кДа є генетично підтвердженим компонентом МП. Участь Cys D в регулюванні МП була виявлена при дослідженні імунодепресантів, зокрема циклоспорину А, який попереджає набухання мітохондрій, і як згодом було показано прямо зв'язується з Cys D. Також показано, що мітохондрії, які втрачають цей компонент стають не чутливими до кальцію та індукції МП окисним стресом. Необхідно відмітити, що хоча цей білок і є критичним у функціонуванні МП, проте самостійно він її не формує, оскільки є

регуляторним, а не структурним компонентом пори [57]. Окрім вищезазначених протеїнів до регуляторних частин також відносили Vcl-2 асоційований протеїн X (Вах), гексокіназу II (НКII), бензодіазепінові рецептори (TSPO) [52].

До сучасної моделі МП відносять також переносник фосфатів (phosphate carrier, PiC), АТФ-синтазу та матриксну металопротеїназу SPG7. Цікавість до переносника фосфатів виникла після появи відомостей про те, що він зв'язується з Сус D. Його чутливість до сульфгідрильних агентів, таких як N-етилмалеїмід та діамід робила його потенційним кандидатом на пороформуючу одиницю МП [58]. Проте подальші дослідження з використанням електрофізіологічних методів показали, що переносник фосфатів характеризується надто низькими струмами (20-30 пс), що не дає змогу йому претендувати на пороформуючу структуру МП. До того ж генетична надекспресія або нокдаун гена переносника ніяк не впливали на функціонування МП [52].

Нині зростає кількість доказів того, що ключовим компонентом МП є АТФ-синтаза. Дослідниками було показано, що Сус D на пряму взаємодіє з АТФ-синтазою, а також ця взаємодія блокується агоністом бензодіазепінових рецепторів Vz-423 [59]. Помістивши в ліпідні бішари очищений АТФ-синтазний комплекс, виявлено, що лише димери можуть формувати канал з провідністю 500 пс і є чутливими до кальцію, Vz-423 та феніларсеноксиду (ФАО). Також провідність каналу знижувалася за наявності АДФ та Mg^{2+} . Відповідно до цієї моделі, зв'язування Сус D з олігоміцинчутливим білком АТФ-синтази (oligomycin sensitivity conferring protein, OSCP) викликає конформаційні зміни в ній, що збільшує спорідненість (афінність) сайту зв'язування з Ca^{2+} , який зазвичай зайнятий Mg^{2+} [60]. Залишається

невизначеним, як саме зв'язування з кальцієм призводить до димеризації та підвищення проникності внутрішньої мембрани мітохондрій.

Нещодавно, використовуючи малі РНК (short hairpin RNA, shRNA) було ідентифіковано матриксну металопротеїназу SPG7, ймовірного компонента МП [61]. Дослідники вибрали 14 протеїнів мітохондрій, які могли брати участь у регуляції МП, і зробили 14 ліній з нокаутним геном кожного з цих білків. Було показано, що кальцієва ємність мітохондрій змінювалася при впливі H_2O_2 у клітинах з нокаутованими генами VDAC, Cys D та SPG7 [61]. Цілком можливо, що SPG7 відіграє певну структурну роль через об'єднання ключових компонентів, проте мало ймовірно, що цей протеїн сам формує канал розміром 1,4 нм на внутрішній мембрані мітохондрій [52].

Під час ішемії метаболізм мітохондрій сповільнюється через зменшення постачання кисню, необхідного для окисного фосфорилування, що призводить до зниження рівня синтезу АТФ. За цих умов відкриваються АТФ-чутливі K^+ -канали саркоплазматичної мембрани, і калій вільно виходить з клітин. Одночасно зі зниженням вмісту метаболітів, концентрація калію в позаклітинному просторі підвищується, що спричиняє зниження потенціалу Ернста для K^+ , деполяризації мембрани і скорочення тривалості потенціалу дії. Протягом ішемії також зростає внутрішньоклітинна концентрація кальцію, ймовірно, внаслідок зниження захоплення Ca^{2+} саркоплазматичним ретикуломом (дефіцит АТФ для роботи SERCA), тоді як ріанодинові рецептори залишаються активними. При цьому значно погіршується процес розслаблення міокарда, що може призвести до ішемічної контрактури, підвищення проникності мітохондріальних мембран та ініціації апоптозу/некрозу [62].

1.4. Функціонування мітохондрій за умов фізіологічного старіння

Старіння характеризується прогресивною втратою функцій органами, що призводить до розвитку дегенеративних розладів та виникнення апоптозу в клітинах [63, 64]. Існує велика кількість даних, які підтверджують так звану мітохондріальну теорію старіння, розвинуту на основі окисної теорії [63-65]. Відповідно до неї рівень утворення активних форм кисню (АФК) підвищується з віком, внаслідок чого зростає ступінь пошкодження мітохондріальної ДНК та виникає дисфункція дихального ланцюга органел. Ці патологічні зміни стають взаємопов'язаними, утворюють цикл, який призводить до прогресивного зниження мітохондріальних функцій, що негативно впливає на функціонування та життєздатність клітин [63].

Мітохондрії – незамінні органели, які забезпечують енергією проходження біохімічних реакцій та виконання органами власних функцій [66]. Відомо, що синтез АТФ асоціюється з утворенням АФК, головним чином, супероксидного аніон-радикала (I та III комплексами дихального ланцюга), який згодом, призводить до формування інших активних радикалів, таких як пероксинітрит, пероксид водню та високореактивний гідроксильний радикал [64]. Це відбувається за фізіологічних умов та регулюється антиоксидантною системою захисту. Проте з віком рівень окисного стресу в клітинах зростає, як унаслідок посиленого утворення вільних радикалів, так і втрати антиоксидантними ферментами своєї активності. Також відомо, що при старінні в клітинах серця зменшується вміст цитохрому *c*, а окиснення жирних кислот знижується на 30% [63]. У разі порушення функціональної здатності мітохондрій, АТФ-синтаза починає гідролізувати АТФ, замість його синтезу, що призводить до виснаження енергії в клітинах та може спричиняти їх загибель [67]. Окрім значного дисбалансу між синтезом АТФ та його використанням, змін у органелах (злиття, роз'єднання) та метаболізмі, які спостерігали при старінні, у мітохондріях кардіоміоцитів також порушується

іонний гомеостаз [63]. Оскільки зниження концентрації АТФ призводить до погіршення роботи АТФ-залежних Ca^{2+} -транспортерів саркоплазматичного ретикулума (SERCA) та плазматичної мембрани, це сприяє підвищенню вмісту Ca^{2+} в цитопламі.

1.5. Характеристика нових регуляторних молекул – газотрансмітерів

Клітинне сигналювання часто залучає складні системи і відбувається в результаті взаємодії між мембранозв'язаними протеїнами та сигнальними молекулами, що діють як вторинні месенджери і передають сигнал у певне місце клітини. Проте на сьогодні відомо низку газових сигнальних молекул, які виконують регуляторні функції та не потребують додаткових факторів регуляції для передачі сигналу [68, 69]. Це – ліпофільні молекули, які синтезуються ендогенно в організмі, вільно проникають через плазматичну мембрану клітини і передають сигнал без посередників [68]. Першою регуляторною молекулою було відкрито оксид азоту (NO), через його здатність розширювати судини та активувати макрофаги. NO утворюється в організмі тварин та людини за допомогою трьох ферментів – NO-синтаз з амінокислоти L-аргініну. Його синтез відбувається в клітинах ендотелію судин, звідки ця газова молекула рухається до клітин гладеньких м'язів, де активує гуанілатциклазу, що посилює синтез циклічного гуанозинмонофосфату. Показано, що введення донора оксиду азоту, терапія NO-інгаляціями чи індукція надекспресії NO-синтаз захищає серце, мозок та печінку від ішемічного ушкодження [70].

Наступним після оксиду азоту було відкрито монооксид карбону (CO), який також мав властивості газового трансмітера. CO утворюється в організмі ендогенно за допомогою гемоксигенази (HO) в процесі деградації гему.

Гемоксигеназа має три ізоформи: НО-1 – індукцибельна, активується за клітинного стресу, НО-2 – гомеостатична форма та НО-3, функції якої ще не до кінця відомі. Як і оксид азоту, монооксид карбону має вазодилаторні властивості через вплив на гуанілатциклазу. Відомо також, що СО захищає організм від гіпертензії, покращує виживаність після ало- та ксенотрансплантації [70].

Третьою газовою молекулою, яка має властивості трансмітера є сірководень (H_2S) [71]. Дослідження H_2S почалися після того як двома японськими вченими Абе та Кімурою у 1996 році було показано модуляцію сірководнем N-метил-d-аспартатних рецепторів у нервовій системі, а дослідником Хозокі у 1997 – його здатність розширювати судини через вплив на АТФ-залежні калієві канали [72, 1]. Проте до того часу цей газ вважався лише смертельно-небезпечним забруднювачем навколишнього середовища. Деякі дослідники припускають, що сірководень міг бути причиною принаймні одного вимирання у Пермсько-Тріасовому періоді близько 251,4 млн. років тому [73]. При цьому вважається, що більша частина сірководню протягом цього періоду формувалася в океанах та атмосфері, призводячи до смерті великої кількості живих організмів. І лише види, що були здатні використовувати H_2S як субстрат під час хемосинтезу змогли вижити та продовжити життя на землі. Вміст сірководню в навколишньому середовищі поступово знижувався і хемотрофи почали витіснятися автотрофами. Проте і на сьогоднішній день хемосинтез підтримується в деяких екосистемах, наприклад у середині глибоководних гідротермальних джерел бактеріями [73].

1.6. Хімічні та біохімічні властивості сірководню (H_2S), його синтез та катаболізм

Сірководень – це безбарвний, легкозаймистий, леткий газ з яскраво вираженим неприємним запахом. Молекулярна маса його становить 34,08 г/моль, а густина – 1,19. [74]. Є два джерела надходження сірководню у повітря: внаслідок розкладання мікроорганізмами органічних сполук, та з неорганічних джерел, до яких належать природний газ, нафта, нафтопереробні заводи, виробництво паперу та целюлози, сірчані відклади та вулканічні гази [74]. У воді сірководень виявляє слабо кислотні властивості, легко розчиняється і дисоціює на іони H^+ , HS^- та S^{2-} . Відомо, що за рН 7,4 1/3 сірководню існує у формі розчиненого газу, тоді як 2/3 становлять HS^- -іони та невелика частина іонів двохвалентної сірки (S^{2-}), враховуючи константу дисоціації ($\text{pK}_{\text{a}1}$), яка для реакції $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{H}^+ + \text{HS}^-$ за температури 25°C у дистильованій воді була 7,05 [75]. Проте за 37°C, температури тіла ссавців, $\text{pK}_{\text{a}1}$ становитиме 6,76 у воді і 6,6 у 140 мМ розчині NaCl. За таких умов за реакцією Хендерсона-Хазельбаха при розчиненні власне H_2S або іонів HS^- (наприклад NaHS), чи S^{2-} (наприклад Na_2S) сірководень в організмі знаходитиметься у таких формах: 14% у газоподібній, 86% у формі HS^- , а іони S^{2-} становитимуть залишкові кількості [75].

Однією з важливих характеристик сірководню є його ліпофільність, що дає йому змогу легко проникати крізь плазматичні мембрани і виконувати фізіологічні функції. Проте він є найменш ліпофільним серед інших газових трансмітерів, що пов'язано з дипольним моментом, який для H_2S становить 0,97, для NO – 0,16, а для CO – 0,13 [74]. Проникність цієї молекули через ліпідний бішар клітинної мембрани визначає його цільову специфіку та механізм дії. H_2S транспортується через клітинну мембрану шляхом простої дифузії, не потребуючи специфічних каналів чи транспортерів. Утворений в організмі H_2S може відразу вступати у взаємодію з іншими сигнальними молекулами, або запасатися у вигляді кислотолабільної сірки чи сульфанів сульфуру [74]. З

кислотолабільних пулів, до яких належать залізо-сірчані кластери мітохондріальних ферментів, атоми сірки вивільняються під дією кислих умов. Для цього рН має бути нижчим ніж 5,4, що не зустрічається за фізіологічних умов. До форм сульфанив сульфурі належать тіосульфати ($S_2O_3^{2-}$), персульфіді ($R-S-SH$), тіосульфонати ($R-S-SO_2-R$), полісульфіді (RS_nR , радикал може бути алкільний або арильний), політіонати ($S_nO_6^{2-}$), елементарна сірка (S_8) і дисульфіді, які мають ненасичений C-S зв'язок. При цьому вивільнення сірководню з сульфанив сульфурі відбувається за лужних умов [74].

Ендогенне утворення сірководню. H_2S синтезується в організмі тварин ензиматичним (за допомогою ферментів) і неензиматичним шляхом (перетворенням тіолів і тіол-вмісних сполук) (рис. 1.4) [74, 6]. До чотирьох найважливіших ферментів синтезу сірководню належать цистатіонін- β -синтаза (cystathionine β -synthase – CBS), цистатіонін- γ -ліаза (cystathionine γ -lyase – CSE), 3-меркаптопіруват сульфуртрасфераза (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase – 3-MPST), яка працює в парі з цистеїнамінотрасферазою (cysteine aminotransferase – CAT). CBS і CSE знаходяться в цитоплазмі клітин і використовують піридоксаль-5-фосфат (П5Ф) як кофермент, тоді як 3-MPST має цитоплазматичну і мітохондріальну локалізацію і не потребує П5Ф для своєї роботи. CAT, як і два вищезазначені ензими, є піридоксаль-5-фосфатнозалежним ферментом.

Основним субстратом для синтезу гідроген сульфіді є амінокислота L-цистеїн. Вона може вивільнятися з білків, або бути синтезованою з ендогенних амінокислот, наприклад з L-метіоніну в реакції транссульфурилювання через гомоцистеїн, як проміжний продукт, а також надходити в організм з продуктами харчування [76].

Для ферментів синтезу сірководню властивий тканинний розподіл. Так, у мозку ссавців, зокрема в гіпокампі, мозочку та півкулях головного мозку за

продукцію H_2S відповідає фермент CBS, тоді як в аорті, клубовій кишці, ворітній вені, печінці, нирках та матці його утворення відбувається переважно за допомогою CSE [77]. Раніше головним ферментом синтезу H_2S у серцево-судинній системі вважали CSE, оскільки було показано, що CSE наявна у великій кількості в артеріях, в ендотеліальних клітинах та клітинах гладеньких м'язів. Проте наразі вважається, що саме 3-MPST є основним ферментом синтезу сірководню в коронарних артеріях серця [7]. Ген фермента 3-MPST експресується також у клітинах ендотелію та гладеньких м'язів судин.

CBS і CSE метаболізують цистеїн і/або гомоцистеїн, вивільняючи при цьому H_2S , тоді як 3-MPST синтезує сірководень з 3-меркаптопірувату (3-MP), який утворюється САТ з цистеїну та α -кетоглутарату. Відомо також, що 3-MPST потребує кофакторів, зокрема тіоредоксину та дигідроліпоевої кислоти. А також показано, що 3-MPST/САТ шлях регулюється кальцієм [78].

Експресію гену CBS підвищують епідермальний фактор росту (EGF), трансформуючий фактор росту α (TGF- α), циклічний аденозин монофосфат (сАМР) [79]. Активність самого ферменту контролюється також алостеричним активатором S-аденозилметіоніном. Оксид азоту може виступати інгібітором CBS, зв'язуючись з гемом, що входить до складу ферменту. Показано, що в умовах запалення експресія CBS зменшується і синтез сірководню відповідно теж. За різних хвороб та патологій утворення сірководню також змінюється. Наприклад, за синдрому Дауна спостерігається збільшення експресії CBS втричі, тоді як у дітей з високим рівнем IQ експресія CBS нижча. Такі дослідження вказують на негативну дію надекспресії гена CBS на когнітивні функції. З іншого боку відсутність CBS призводить до захворювань, наприклад, гомоцистеїнемії [79].

Регуляція експресії гена CSE вивчена гірше, ніж CBS. Відомо лише, що на експресію гена CSE позитивно впливають донори оксиду азоту S-нітрито-

N-ацетил-пеніциламін (SNAP) та нітропрусид натрію (SNP). Активність ферменту CSE регулюється також комплексом кальцій-кальмодулін [77].

Дуже мало відомо про механізми регуляції активності ферментів 3-MST та CAT. Показано лише, що спорідненість ферменту CAT до цистеїну є у 20 разів меншою, ніж до аспартату, оскільки константи Міхаеліса (K_m) їхніх реакцій становлять 22 мМ та 1,6 мМ відповідно, тому збільшення концентрації аспартату, призводить до інгібування цього шляху синтезу сірководню [6].

Цитоплазма

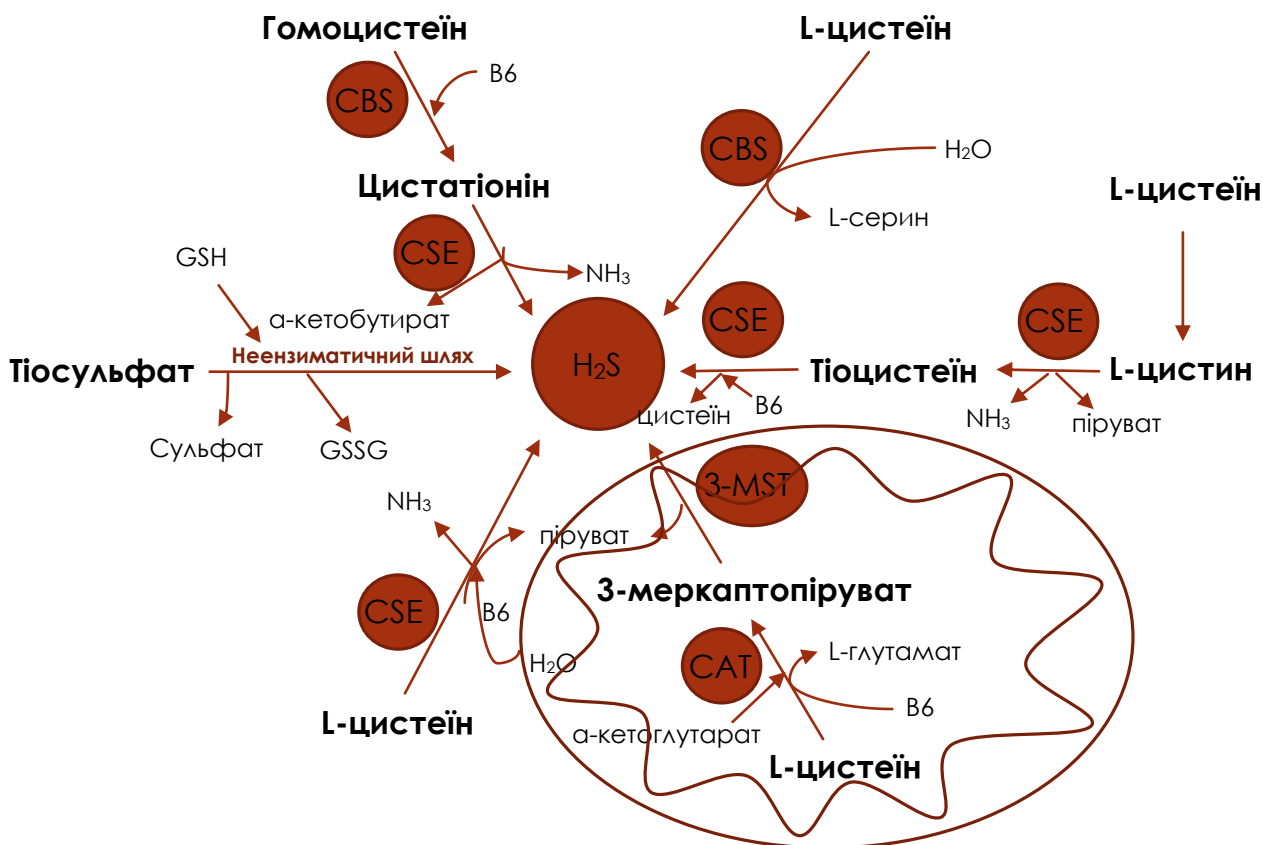


Рис. 1.2. Схема синтезу сірководню [74].

Катаболізм сірководню в організмі ссавців. Метаболізується сірководень у мітохондріях, через окиснення сульфідів [80]. Перший крок каталізується ферментом сульфідхінооксидоредуктазою (SQR), яка окиснює

сірководень до персульфідів. Спочатку SQR були ідентифіковані у безхребетних, а потім і ссавців. За наявності кисню і води сульфурдиоксигеназа окиснює персульфіди до сульфатів, які поєднуються з іншою молекулою персульфіду ферментом сульфуртрансферазою роденазою, утворюючи тіосульфат. Оскільки за аеробних умов споживання сірководню диоксигеназою достатньо високе, тому високий рівень синтезу компенсується швидким кліренсом газу, а базальний вміст вільного сірководню зазвичай низький [81]. Кінцеві продукти цього шляху – сульфати виводяться з організму з сечею. Інший метаболічний шлях залучає метилювання сульфідів цитозольним ферментом S-метилтрансферазою до метантиолів (CH_3SH) та диметилсульфідів (CH_3SCH_3), які у свою чергу є субстратом (у ободовій кишці) для ферменту тіосульфатціанідсульфуртрансферази, внаслідок роботи якої утворюються тіоціанат (SCN^-) та SO_4^{2-} [2]. H_2S також може зв'язуватися з метгемоглобіном, з метало- чи дисульфідвмісними молекулами, такими як окиснений глутатіон [2]. Сірководень може виводитися з організму ссавців через легені. Проте видихуване повітря здорового організму зазвичай містить дуже незначні кількості цього газу (25-50 ppb). Тобто основним шляхом виведення сірководню з організму є виведення з сечею у формі сульфатів. Підвищення концентрації сірководню у видихуваному повітрі спостерігається за різних патофізіологічних станів, зокрема за септичного шоку, геморагічного шоку та панкреатиту. Проте слід додати, що сірководень сильний відновник і в організмі швидше за все даний газ буде захоплюватися такими окисниками як пероксинітрит, супероксид та гідроген пероксид [2].

1.7. Функції H_2S у серцево-судинній системі

У 1997 році Хозокі вперше продемонстрував, що в артеріях та венах експресується фермент синтезу сірководню – цистатіонін- γ -ліаза (CSE).

Згодом почали активно досліджувати фізіологічну роль цієї газової молекули у судинах ссавців, оскільки на той час вже була відома важлива участь оксиду азоту у підтриманні тонуусу судин [1]. Спочатку було відкрито властивість сірководню розслабляти ворітну вену та аорту, а пізніше стало зрозуміло, що цей газовий трансмітер здатен діяти як вазорелаксанти і для інших судин. Основними механізмами розслаблення судин під впливом сірководню є відкриття АТФ-залежних калієвих каналів, ендотелійзалежний механізм, залучення внутрішньоклітинного ацидозу та зниження концентрації внутрішньоклітинного АТФ в кільцях аорти [6].

Нині відомо, що сірководень регулює функціонування серцево-судинної системи кількома шляхами. Передусім, це його антиоксидантні впливи через підвищення активності Mn-залежної та Cu-залежної супероксиддисмутази (Mn-SOD та Cu-SOD), а також зниження вмісту АФК в кардіоміоцитах під час ішемії-реперфузії [2]. Також показано, що він знижує перекисне окиснення ліпідів, захоплюючи пероксид водню і супероксидний радикал в моделі ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда. Захищає функції мітохондрій, інгібуючи цитохром с оксидазу та попереджає відкриття МП [4, 82]. Сірководень також характеризується своїми антиапоптичними властивостями. Більшість науковців вважають, що дія H_2S сприяє збереженню мітохондріальних функцій. Також показано, що сірководень захищає кардіоміоцити від апоптозу, викликаного високою концентрацією глюкози змінюючи експресію генів Bax і Bcl-2 [83]. Він здатен знижувати активацію каспази 3, підвищувати фосфорилування глікогенсинтази кінази 3- β , що інгібуює відкриття МП [84]. Протизапальна функція сірководню пов'язана з його здатністю знижувати рівень лейкоцитів та нейтрофілів в зоні ішемії, а також знижувати вміст TNF- α , IL-6, IL-8 та активність мієлопероксидази [85, 86]. Показано також, що сірководень стимулює ангіогенез через АТФ-залежні

К канали, активацію фосфатидилінозитол-3-кінази та Акт [87]. Безсумнівно газові медіатори взаємодіють між собою, регулюючи роботу один одного. Показано, що сірководень захищає серце від ішемічно-реперфузійного пошкодження, підвищуючи продукцію NO [88]. Також показано, що сірководень активує ендотеліальну NO-синтазу [89]. Вважається, що NO та пероксинітрит реагують з сірководнем, формують при цьому нітрозотіоли, які також мають регуляторні функції. Показано, що додавання донора сірководню у вигляді діалілу трисульфідів підвищує вміст нітритів і нітратів, а також рівень нітрозилування протеїнів. З іншого боку нокаут гена CSE у мишей призводить до зниження рівня сірководню і сульфанів сульфуру у тканинах і крові [90].

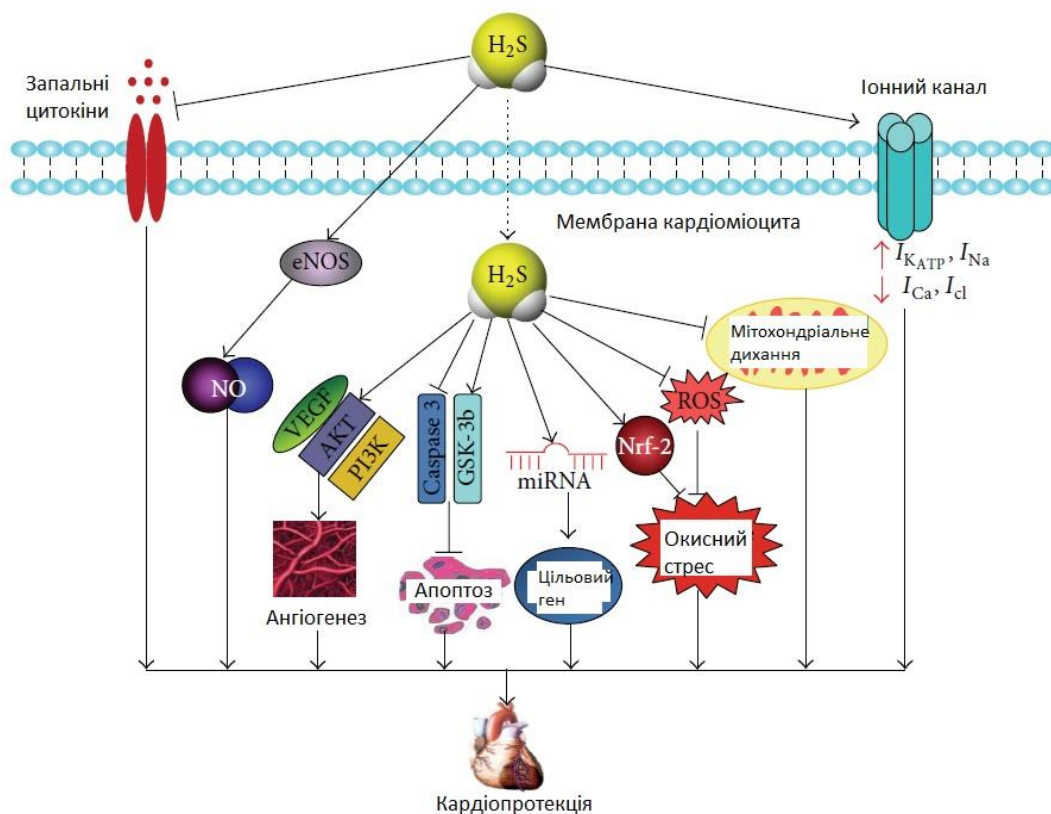


Рис 1.3. Функції H₂S у серцево-судинній системі [3].

На клітинному рівні сірководень впливає на три основні типи клітин у серцево-судинній системі. Відомо, що в ендотеліальних клітинах судин він прямо активує рецептор 2 ендотеліального фактора росту судин VEGFR2 [90], що призводить до фосфорилування Akt і p38 мітогенактивованих кіназ MAPK та підвищує їх міграцію [91]. Як відомо, ендотеліальні клітини відіграють ключову роль у контролюванні потоку крові, коагуляції та судинному тонусі, а ендотеліальна дисфункція запускає та загострює патологічні стани серцево-судинної системи. Показано, що сірководень також інгібує активність ангіотензин-перетворювального ферменту (angiotensin-converting enzyme, ACE), що призводить до зниження утворення ангіотензину II та вазорелаксації у культурі клітин HUVEC [92]. При діабеті 2-го типу H_2S відновлює функції попередників ендотеліальних клітин (endothelial progenitor cell, EPC). Отже, ендогенний синтез H_2S є природним для ендотеліальних клітин, а інгібування CSE призводить до внутрішньоклітинного окисного стресу та апоптозу ендотеліальних клітин [93].

Показано, що сірководень інгібує проліферацію гладко-м'язових клітин (ГМК) та попереджає ремоделювання судин. Клітини гладеньких м'язів судин виконують важливі функції підтримання судинного тонусу під дією гуморальних та нервових чинників. При патології, ці клітини можуть перетворюватися на пінисті клітини, що призводить до атеросклерозу. ГМК, в яких синтез H_2S знижується, мають підвищену експресію матриксної металопротеїнази-2 (MMP-2) та мігрують швидше [94]. Активація кальційчутливого рецептора підвищує ендогенний вміст сірководню і захищає артерії діабетиків від потовщення. Отже, сірководень є захисним фактором проти пошкоджень судин при діабеті та атеросклерозі. З іншої сторони надмірна експресія CSE індукує апоптоз ГМК [95].

У кардіоміоцитах, які є головними клітинами серця ссавців, сірководень активує АТФ-залежні калієві канали, інгібує кальцієві канали L-типу та калієві канали [96, 97]. Ці ефекти призводять до пролонгованої тривалості потенціалу та негативного ізотропного ефекту, а також захищають від аритмій *in vivo*. Також сірководень підвищує активність кінази ERK (extracellular signal-regulated kinase, ERK), інгібує фосфорилування кінази JNK (c-Jun N-terminal kinase, JNK) та знижує внутрішньоклітинну концентрацію АФК, захищаючи таким чином кардіоміоцити від ішемії [4, 98]. Також сірководень сприяє використанню глюкози в гіпертрофованих кардіоміоцитах та послаблює гіпертрофію міокарда.

Механізми дії сірководню. Одним з механізмів дії H_2S є відновлення дисульфідних зв'язків цистеїну, що призводить до конформаційних змін в білках. Першим було ідентифіковано VEGFR2, як пряму молекулярну мішень проангіогенної дії сірководню [90]. Так, віднайдено дисульфідний зв'язок, розміщений у внутрішньоклітинному домені кінази VEGFR2, який є мішенню для дії сірководню. Коли H_2S руйнує зв'язок Cys1024-S-S-Cys1045, конформаційні зміни в структурі молекули призводять до активації цього ферменту.

Відомо, що H_2S підвищує фосфорилування інсулінового рецептора і вхід глюкози, покращує метаболізм глюкози в модельних тварин з діабетом 2-го типу та захищає функцію нирок. Також було підтверджено пряму взаємодію між H_2S та рецептором епідермального фактора росту (EGFR). Сірководень індукує розщеплення дисульфідних зв'язків у внутрішньоклітинному кіназному домені EGFR та активує шлях EGFR/gab1/PI3K/Akt [99].

Слід додати, що не всі дисульфідні зв'язки чутливі до дії сірководню. Наприклад, підвищення активності γ -глутамілцистеїнсинтетази при дії

екзогенного H_2S , ймовірно, спричинене іншими механізмами дії, а не впливом на дисульфідний зв'язок, оскільки прямий вплив сірководню не був показаний.

Показано інший механізм сигналювання сірководню, а саме сульфгідрування протеїнів – процес модифікації цистеїнових залишків з утворенням персульфідних зв'язків (-SSH) [100]. Деякими авторами вказано, що H_2S сульфгідрує 10-25% протеїнів печінки. Як приклад можна навести S-сульфгідрування вільних -SH груп Cys150 в гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназі (GAPDH), що призводить до підвищення її активності [101]. Цікавим виявився той факт, що S-нітрозилювання цистеїну в цій позиції зменшує активність ензиму. Це є прикладом реципрокного впливу оксиду азоту та сірководню в організмі ссавців [102].

На сьогодні відомо, що S-сульфгідрування: K_{ATP} -каналів стимулює H_2S -індуковану вазодилатацію судин; ядерного фактора kB (NF- kB) – інгібує апоптоз; протеїнів родини тирозин фосфатаз-1B – регулює стрес ендоплазматичного ретикулума; каналів TRP (transient receptor potential) – забезпечує нормальне надходження кальцію у стовбурові клітини і підтримує їхню функцію [103].

Окрім розщеплення дисульфідних зв'язків сірководень взаємодіє з протеїнами, які містять гем, такими як гемоглобін та цитохром-с-оксидаза. H_2S є токсичним у високих концентраціях, тоді як в помірних 500 μM зворотно інгібує цитохром-с-оксидазу, зв'язуючи Fe^{2+} -порфірин в активному сайті та індукуючи, таким чином, сплячий стан організму (hibernation) [104].

Показано, що сірководень активує CuZn-супероксиддисмутазу (SOD), яка знаходиться в цитоплазмі клітин та зовнішньоклітинному просторі, а також підвищує експресію та активність Mn-SOD, яка локалізується в мітохондріях. Це один з механізмів антиоксидантної функції сірководню [2]. Також з'ясовано, що сірководень пригнічує активність

ангіотензинперетворювального ферменту, що призводить до розширення пуповинної вени та взаємодіє з матриксними металопротеїназами – Zn-залежними пептидазами, які селективно руйнують протеїни зовнішньоклітинного матриксу, сприяючи ремоделюванню судин, ангіогенезу та знижуючи фіброз міокарда, захищаючи таким чином серце від гіпертрофії [105, 106].

Ідентифіковано декілька транскрипційних факторів, які є мішенями для H_2S . До них належить NF- κ B, активатор транскрипції STAT3, еритроїд-2-подібний фактор 2 (Nrf2), фактор індукований гіпоксією-1 (HIF-1) [107].

В нормі більша частина фактору NF- κ B зв'язана з інгібітором (I κ B- α) в цитозолі. Під час запалення, відбувається фосфорилування і деградація інгібітора, а NF- κ B транслокується в ядро. Існують відомості, що сірководень інгібує деградацію I κ B-альфа і транслокацію NF- κ B в культурі клітин HUVEC, стимульованих TNF і таким чином, діє як протизапальний агент [108].

Транскрипційний фактор HIF-1 швидко деградує за аеробних умов і залишається стабільним під час гіпоксії. Виявлено, що NaHS дозозалежно підвищує рівень мРНК та протеїну HIF-1 α у культурі ендотеліальних клітин, а також підвищує міграцію клітин за нормоксії. Хоча, за дії NaHS у високих концентраціях інгібується експресія HIF-1 α протягом 2 годин за гіпоксичних умов в різних культурах клітин [109].

Сірководень регулює MAPK та інші кінази. Як відомо сигналювання MAPK відіграє ключову роль в рості клітин, диференціюванні та відповіді на стрес. Підвищення фосфорилування Akt є ключовим механізмом проангіогенного ефекту сірководню. Сірководень та інгібітори JNK достовірно інгібують фосфорилування JNK та послаблюють апоптоз клітин за ішемії-реперфузії в первинній культурі кардіоміоцитів. Цікаво, цей захисний

ефект сірководню є часозалежним, введення H_2S має здійснюватися протягом 1 години після реперфузії [110].

Також відомо, що захисний ефект сірководню під час прекодиціювання та посткодиціювання здійснюється за рахунок дії на протеїнкіназу С (PKC). Як зазначалося раніше, VEGFR 2, IR та EGFR це мембранні протеїни, які є мішенями сірководню. Ще дослідник Kimura показав, що NMDA-рецептори, які експресуються в мембранах ооцитів ксенопуса активуються H_2S . Підвищена чутливість цих рецепторів до N-метил-D-аспартатної кислоти відноситься до H_2S -індукованої продукції циклічного аденозинмонофосфату (сAMP) [111].

Також відомо, що сірководень активує іонні канали, зокрема K_{ATP} -канали в аорті та брижкових артеріях, призводячи таким чином до вазодилатації цих судин. Також H_2S активує ці канали і в кардіоміоцитах, що є механізмом його дії під час пре- і посткодиціювання під час ішемії-реперфузії [97, 112].

Давно відомо, що сірководень дозозалежно та зворотно інгібує кальцієві канали L-типу в ізольованих кардіоміоцитах щурів ліній Вістар та спонтанно гіпертензивних щурів (SHR). Це пригнічення викликає суттєве зниження тривалості реполяризації та пікового потенціалу та негативного інотропного ефекту [96]. Схожі ефекти дії сірководню на кальцієві канали L-типу також спостерігали на культурі кардіоміобластів та ізольованих міоцитах мозкових артерій.

Показано, що сірководень активізує TRPA 1 канал та індукує кальцієві відповіді у культурі клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO), які експресують цей канал [113]. Також сірководень індукує персульфідацію трьох інших TRP каналів (TRPV3, TRPV6, TRPM4), і дає змогу забезпечити

достатнє надходження кальцію до мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку [114].

Вплив сірководню (H_2S) на функціонування мітохондрій. Як зазначалося вище, в мітохондріях у процесі окисного фосфорилування синтезується АТФ, молекула з високоенергетичними фосфатними зв'язками. Багато фотоавтотрофних та хемоавтотрофних бактерій та певні види тварин використовують сульфідни як енергетичні субстрати. Відомо, що сірководень може покращити мітохондріальний синтез АТФ у клітинах гладеньких м'язів з порушеним синтезом АТФ, особливо при подальшій гіпоксії [115]. Було показано, що H_2S може різко знизити метаболічний попит. Це означає, що метаболізм сірководню в мітохондріях може слугувати засобом для енергозбереження. Сірководень може функціонувати як енергетичний субстрат для підтримання синтезу АТФ за стресових умов. Іншими словами, у поєднанні з гіпоксією, H_2S може допомогти продукувати АТФ [77]. Також показано, що у відповідь на гіпоксію фермент CSE може переміщуватися з цитозолу в мітохондрії, ймовірно для того, щоб підвищити його синтез в органелах [115]. Переміщення CSE також активується підвищеною концентрацією внутрішньоклітинного рівня кальцію через кальцієвий іонофор. Транслокація CSE в мітохондрії метаболізує цистеїн і підвищує синтез АТФ в середині мітохондрій і підвищує синтез АТФ [77].

Виявлено, що сірководень захищає нейрони від окисного стресу, підвищуючи концентрації відновленого глутатіону (GSH), основного внутрішньоклітинного антиоксиданта [116]. Це відбувається трьома різними механізмами: підвищуючи синтез глутатіону, а також рівні транспортерів цистину/цистеїну та перерозподіляючи локалізацію відновленого глутатіону до мітохондрій [116].

Мітохондрії є головним джерелом окисного стресу. Гострий окисний стрес спричиняє серйозні пошкодження в тканинах, а хронічний окисний стрес є головною причиною старіння та низки захворювань, зокрема і раку. Оскільки у мітохондріях здійснюється окисне фосфорилування і вони залучені у різноманітні аспекти апоптозу, їхня дисфункція призводить до широкої низки різних патологій. Метаболізм сірководню виникає в трьох напрямках: окиснення, метилювання та реакції з цитохромом С та іншими металопротейнами чи дисульфідвмісними білками. Головним метаболічним шляхом сірководню є швидке багатокрокове окиснення у печінці сульфідів до сульфатів і подальша елімінація сульфатів разом з сечею. Дуже чутливими до зміни метаболізму мітохондрій є тканини, які мають високі потреби у кисню, наприклад мозок та серце. Першим механізмом токсичної дії сірководню є пряме інгібування цитохром-с-оксидази, критичних ензимів для мітохондріального дихання.

Під час ішемії-реперфузії мітохондрії піддаються кисневому голодуванню, надмірній продукції та впливам АФК та деполаризації мітохондріальної мембрани. Показано, що сірководень у високих концентраціях може індукувати гіпотермію у мишей, через інгібування цитохромоксидази, що проявляється у зниженні швидкості метаболізму та температури тіла. Проте такий ефект під час ішемії може бути корисним та захисним. Інгібування мітохондріального дихання сірководнем знижує продукцію АФК та чинить цитопротекторний ефект [77].

Взаємодія сірководню і оксиду азоту у серцево-судинній системі

Окрім сірководню до родини газотрансмітерів належить також оксид азоту (NO) та оксид карбону (CO). Газотрансмітери можуть взаємно впливати один на одного, як прямо, так і впливаючи на синтез та мішені дії іншого газового медіатора. Показано, що високі концентрації NO мають негативний

інотропний ефект, який виникає через підвищення внутрішньоклітинного цГМФ, що знижує чутливість міофіламентів до кальцію та підвищує розслаблення серцевого м'яза [117]. При цьому NO, синтезований nNOS підвищує скоротливість міокарду, шляхом прямого S-нітрозилювання ріанодинових рецепторів [118]. Негативний інотропний вплив також має сірководень, активуючи K_{ATP} канали, блокуючи кальцієві канали L-типу та інгібуючи cAMF сигнальний шлях [96]. При цьому нітроксил HNO - продукт, який може утворюватися від взаємодії H₂S і NO має позитивний інотропний ефект, ймовірно через стимуляцію кальцитонін ген-подібного пептиду і посилюючи колообіг кальцію у саркоплазматичному ретикулумі [119]. Сірководень та оксид азоту можуть також співпрацювати для захисту серця від ішемічно-реперфузійного пошкодження. Показано, що інгібування NO неспецифічним інгібітором NO синтаз L-NAME послаблює кардіопротекторну дію H₂S [120]. Введення NaHS послаблює ізопроterenол-індуковану токсичну кардіоміопатію через підвищення рівня NO в міокарді та в сироватці [121]. H₂S може регулювати продукцію NO шляхом модуляції активності та експресії eNOS та iNOS [122]. Більше того, показано, що порушення функції eNOS та зниження вмісту NO знаходили у нокаутних мишей за геном CSE. З іншого боку деякі протилежні результати отримали при вивченні кілець аорти, де показали, що сірководень прямо інгібує активність рекомбінантної бичачої eNOS [123], а також, що екзогенний ти ендогенний H₂S інгібував активність та транскрипцію eNOS [124]. Отже, судячи з усього взаємодія газових трансмітерів залежить від багатьох факторів, зокрема їхні концентрації і не може бути інтерпретована в одному напрямку.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт досліджень

В експериментах використовували дорослих (віком 5 – 6 міс.) та старих (22 – 24 міс.) щурів самців лінії Вістар масою 250 – 350 г., яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Дослідження проведені з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986). Експериментальна частина виконана на ... тваринах, з яких ... дорослих та ... старі щурів.

2.2. Методика виділення мітохондрій та реєстрація відкриття мітохондріальної пори

2.2.1. Виділення мітохондрій із серця щурів. Експериментальних тварин було декапітовано за допомогою гільйотини. Серця видаляли та ретельно промивали охолодженим 0,9 %-м розчином KCl (2 °C), подрібнювали і гомогенізували у 9-кратному об'ємі середовища для виділення мітохондрій (табл. 2.1.), рН якого становив 7,2. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування. Для цього гомогенат серця центрифугували при 700g протягом 8 хв, за температури 2 °C для осадження ядер і клітинної фракції. Отриманий супернатант центрифугували при 11000g протягом 16 хв (2°C). Фракцію мітохондрій ресуспендували в середовищі для ресуспендування мітохондрій (рН 7,2) (табл. 2.2). Суспензію органел

використовували для експериментальних цілей протягом 2-4 годин. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [125].

Середовище для виділення мітохондрій

Таблиця 2.1

Речовина	Концентрація, ммоль/л
Сахароза	250
Тріс- HCl буфер	25
EGTA	1

Середовище для ресуспендування мітохондрій

Таблиця 2.2

Речовина	Концентрація, ммоль/л
Сахароза	250
Тріс- HCl буфер	25

Середовище інкубації видієних мітохондрій

Таблиця 2.3.

Речовина	Концентрація, ммоль/л
KCl	120
Тріс- HCl	25
KH ₂ PO ₄	3
Сукцинат натрію	5

2.2.2. Визначення білка за Лоурі. Принцип методу базується на колориметричному визначенні продуктів відновлення фосфорномолібденового-фосфорновольфрамowego реагенту Фоліна купрум-

білковим комплексом. В лужному середовищі іони Cu^{2+} утворюють комплекс з пептидними зв'язками, переходячи в Cu^+ . Одновалентні іони міді взаємодіють з реактивом Фоліна (фосфомолібденова кислота з фенолом), утворюючи нестабільний продукт, що переходить в молібденову синь, з максимумом адсорбції при довжині хвилі 750 нм. Збільшення адсорбції при 750 нм пропорційне концентрації білка. Метод дуже чутливий до наявності у розчині сторонніх відновників, що ускладнює його використання при визначенні білка в неочищених препаратах. Чутливість до білку становить 10-100 мкг/мл.

В ході визначення відбирали по 10 мкл суспензії білка, додавали краплину додецилсульфатнатрію, як денатуруючого агента, доводили до 0,5 мл бідистильованою водою, додавали 5 мл реактиву III і залишали на 15 хв. Через 15 хв інкубації додавали 0,5 мл реактиву Фоліна і залишали ще на 30 хв. Вимірювання проводили на фотоелектроколориметрі, при довжині хвилі 750 нм. Знаходили значення концентрації білка у досліджуваній суспензії мітохондрій за калібрувальним графіком і розраховували, яку кількість вихідної суспензії необхідно взяти, щоб концентрація білка в 1 мл становила 0,5 мг/мл.

2.2.3. Реєстрація відкривання мітохондріальної пори. Визначення відкривання мітохондріальної пори проводили, реєструючи набухання органел, тобто зменшення їх оптичної густини, використовуючи спектрофотометр СФ-46. Для цього мітохондрії поміщали в середовище інкубації ізотонічного складу, кінцевий об'єм, якого становив 3 мл. Вимірювання проводили при $\lambda=520\text{нм}$, знімаючи показники щохвилини протягом 15 хв. Концентрація білка в кожній пробі становила 0,5 мг/мл. В якості контролю використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора Ca^{2+} та за відсутності

інших речовин з реєстрацією величини оптичної густини також протягом 15 хв. Зміни оптичної густини мітохондрій на 15-ій хв набування після дії на них реакційних речовин виражали у відсотках (%) відносно величини оптичної густини на 1-ій хвилині набування. Вплив на мітохондріальну пору донора сірководню вивчали, додаючи розчинений у фізіологічному розчині NaHS у діапазоні концентрацій від 10^{-12} до 10^{-4} моль/л.

2.3. Вивчення акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями

Для дослідження акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями, органели навантажували флуоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2,5 мкмоль/л протягом 30 хв при 37, 26 і 22°C. Цей барвник використовується у вигляді ацетоксиметильного естеру, незарядженої сполуки, що вільно проникає у клітини, а у нашому випадку – мітохондрії, де потім неспецифічні естерази розщеплюють складнофірні зв'язки, перетворюючи його в заряджену кислотну форму зонда, який не може вийти з місця локалізації. Збудження Fluo-4 AM відбувається за довжини хвилі 488 нм, що дає змогу використовувати його на приладах, обладнаних аргонним лазером, а інтенсивність флуоресценції зростає у відповідь на зв'язування з Ca^{2+} . Для покращення процесу навантаження барвник змішували з Pluronic F-127 (0,02%-й), як описано у протоколі навантаження для Fluo-3 AM [126]. Виміри здійснювали у середовищі інкубації з наступним складом (ммоль/л): KCl – 120; KH_2PO_4 – 3; тріс-HCl – 25; сукцинат Na – 5, 0,1%-й бичачий сироватковий альбумін (БСА). Вимірювання флуоресценції проводили до внесення розчину CaCl_2 у середовище інкубації (вихідні значення) і після – на 1, 3, 5, 7, 9, 11 та 23-й хвилині. Отримані результати представлено в умовних одиницях інтенсивності флуоресценції.

Накопичення кальцію мітохондріями реєстрували на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XL™ («Beckman Coulter», США) з аргонним лазером, який дає змогу якісно та кількісно досліджувати біологічні і фізичні властивості клітин і субклітинних структур. Створений робочий протокол містив логічне обмеження для реєстрації зразків за прямим та бічним світлорозсіюванням. Аналіз проб припиняли за умови реєстрації 10 000 подій в обмеженій ділянці.

2.4. Вивчення мембранного потенціалу виділених мітохондрій

Для дослідження мітохондріального потенціалу методом, запропонованим Брандом, органели інкубували в середовищі, що містило (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25, KН₂PO₄ – 3, 5% знежиреного БСА; рН 7,2 – 7,4 [127]. У герметичну термостатовану камеру (37°C), обладнану ТРМР-селективним електродом (від англ. triphenylmethylphosphonium sensitive electrode) і електродом Кларка, вносили мітохондрії з розрахунку 0,5 мг/мл білка. Роботу першого комплексу дихального ланцюга блокували ротеноном ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л), а АТФ-синтази – олігоміцином (10^{-7} моль/л). Для ініціації дихання вносили сукцинат натрію (5 ммоль/л). Поглинання кисню суспензією мітохондрій реєстрували за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk 2 (Данія), а зміни концентрації ТРМР – рН-метра PP-25 «Sartorius» (Німеччина). Мембранний потенціал мітохондрій розраховували за рівнянням Нернста, приймаючи значення внутрішнього об'єму мітохондрій за 0,65 мкл/мг білка [128].

2.5. Реєстрація показників скоротливої функції ізольованого серця щурів

Перфузію коронарних судин ізольованого серця щурів здійснювали за методом Лангендорфа [129].

Декапітацію експериментальних тварин проводили за допомогою гільйотини. Після торакотомії серце швидко вилучали і одразу поміщали в охолоджений (5°C) розчин Кребса-Хензеляйта до повної його зупинки. Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно через аорту в умовах постійного тиску 75-80 мм рт.ст., при 37°C розчином Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO_4 – 1,2; NaHCO_3 – 24; KH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 10; CaCl_2 – 1,7, який безперервно аерували карбогеном (95% O_2 , і 5% CO_2). Методика навантаження ізольованого серця кальцієм передбачала додавання CaCl_2 у перфузійний розчин Кребса-Хензеляйта кожні 10 хв, концентрація якого зростала від 1,7 до 12,5 ммоль/л. За таких умов вивчали зміни показників скоротливої активності ізольованого серця на тлі блокади ферменту синтезу сірководню 3-MST інгібітором О-карбоксиметилгідроксиламіном (О-СМН, 50 мг/кг), який вводили внутрішньоочеревинного за 30 хв до початку експерименту. Як контроль використовували серця нативних тварин.

Тиск у порожнині лівого шлуночка ($P_{\text{шл}}$) та його першу похідну (dP/dt_{max} і dP/dt_{min}), кінцевий діастолічний тиск (КДТ) та частоту серцевих скорочень (ЧСС) вимірювали за допомогою латексного балончика тензодатчиком 746 («Мінгограф-82», «Елема», Швеція) і реєстрували на комп'ютері, використовуючи програмне забезпечення Global Lab. Коронарний потік оцінювали як об'єм перфузійного розчину, який відтікав від серця за 1хв. Для розрахунку споживання кисню міокардом за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk-2 («Radiometer», Данія) реєстрували напруження кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця. Кисневу вартість роботи серця

виражали як співвідношення споживання кисню до інтенсивності скоротливої функції серця (ІСФ – добуток ТЛШ та частоти серцевих скорочень).

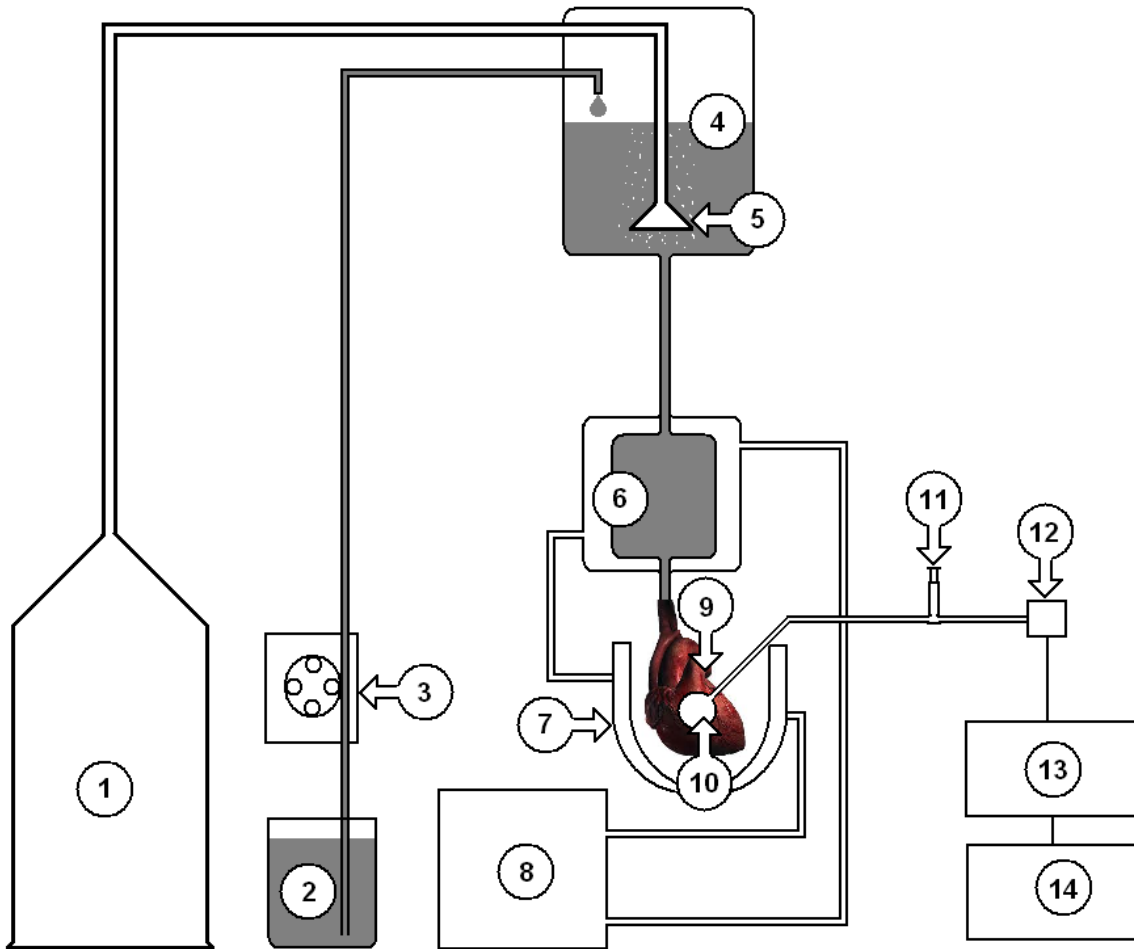


Рис. 2.1. Схема установки для перфузії ізольованого серця за Лангендорфом при постійному тиску. 1 – балон з карбогеном; 2 – резервуар з розчином Кребса-Хейнзелейта; 3 – перистальтичний насос; 4 – резервуар з перфузійним розчином Кребса-Хейнзелейта, насиченим киснем; 5 – розпилювач; 6 – колба для обігріву перфузійного розчину та для стравлення газу; 7 – термостатована камера для обігріву серця; 8 – ультратермостат; 9 – ізольоване серце; 10 – поліетиленовий балончик у лівому шлуночку; 11 – шприц, що підтримує

герметичність системи „балончик-тензодатчик”; 12 – тензодатчик вимірювання тиску в лівому шлуночку; 13 – підсилювач; 14 – самописець.

2.6. Дослідження мітохондріального дихання за допомогою системи Oxygraph+

Процеси мітохондріального дихання досліджували полярографічним методом з використанням закритого електроду Кларка за допомогою приладу “Oxygraph+” («Hansatech instruments», Великобританія). Вперше метод, який дозволяє вимірювати концентрацію кисню в біологічній рідині, був розроблений та описаний в 50-их роках 20 ст. американським дослідником Леландом Кларком .

Основна частина приладу містить індикаторний електрод з платини та електрод порівняння із срібла, який зверху вкритий пастою з хлориду срібла (AgCl). Катод, у даному випадку платиновий електрод, вкритий тефлоновою мембраною, яка проникна лише для молекул кисню, і не проникна для будь-яких іонів та інших відновників. В простір між електродами і мембраною залитий електроліт – водний розчин KCl. До даного пристрою подається напруга у 0,6 – 0,8 В. Якщо у досліджуваному середовищі відсутній кисень, то при подачі напруги між індикаторним електродом та електродом порівняння встановиться слабкий електричний струм. Принцип полярографічного методу ґрунтується на тому, що зростання електричного струму, яке відбувається при відновленні платиною молекул кисню, що дифундують через мембрану з середовища можна зафіксувати. Зменшення концентрації кисню з часом, внаслідок поглинання його мітохондріями прямо корелює зі зменшенням струму і відображається на кривій оксиграфа.

Відновлення розчиненого кисню до гідроксилу на катоді відбувається за такою реакцією, що зображена на рис. 2.1.

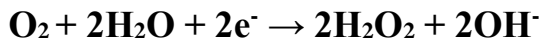


Рис. 2.1. Реакція, що проходить на платиновій пластинці оксиграфа.

Реакція на аноді – це окиснення срібла, що забезпечує утворення електричного струму, який є пропорційним до парціального тиску кисню ($p\text{O}_2$) в експериментальних розчинах залежно від концентрації (рис. 2.2).

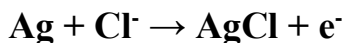


Рис. 2.2. Реакція, що проходить на аноді оксиграфа.



Рис. 2.3. Загальне рівняння процесу.

Для калібрування електродів використовували середовище насичене киснем і гіпосульфит натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) для виставлення нулевого значення $p\text{O}_2$. Для того, щоб перевести $p\text{O}_2$ в концентрацію кисню, необхідно знати розчинність кисню у середовищі, що є функцією від температури і концентрації солі. Для підтримання температури 26°C в кюветі приладу використовували термостат.

Функціональний стан мітохондрій визначали за показниками Чанса [130]. V_2 – це швидкість дихання мітохондрій у стані відносного спокою (за наявності субстратів окиснення – сукцинату натрію і глутамату та за відсутності субстрату фосфорилування – АДФ), V_3 – швидкість дихання мітохондрій за високої концентрації у середовищі сукцинату натрію та наявності субстрату фосфорилування – АДФ, V_4 – швидкість поглинання кисню мітохондріями, коли у середовищі зменшується концентрація АДФ, за рахунок функціонування мітохондрій. Розраховували показник дихального контролю (ДК), який показує якість роботи мітохондрій і є відношенням

швидкостей V_3 та V_4 , а також показник спряженості процесів окиснення та фосфорилування – АДФ/О

Спочатку у кювету приладу вносили середовище інкубації (рН 7,2) такого складу: КСІ – 120 ммоль/л, тріс-НСІ – 25 ммоль/л, KH_2PO_4 – 3 ммоль/л. Потім додавали 20 мкл сукцинату натрію у концентрації 5 ммоль/л, у якості субстрату окиснення. Суспензія мітохондрій додавалася у середовище невідомої концентрації, оскільки концентрацію білку визначали після роботи з мітохондріями, а під час розрахунків отримані результати перераховували на 1г білку. Дихання мітохондрій стимулювали додаванням 200 мкмоль/л АДФ. Дослідження впливу донора сірководню на мітохондріальне дихання проводили, додаючи у кювету 10 мкл NaHS (концентрацією від 10^{-6} до 10^{-9} моль/л) після додавання мітохондрій.

Стан активного дихання називають станом 3, тоді як стан повільнішого дихання, після того, як весь доданий АДФ фосфорилується називають стан 4. Стан 4 зазвичай швидший ніж стан 2 за Чансом, до додавання АДФ, оскільки деяка кількість АТФ може перетворюватись на АДФ за допомогою АТФази і активувати дихання.

2.7. Визначення концентрації H_2S в мітохондріях щурів різних груп

Для визначення концентрації сірководню у мітохондріях серця тварин різних груп спочатку було виділено мітохондрії. До 0,1 мл суспензії мітохондрій, додавали 0,5 мл розчину ацетату цинку ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) і закривали кришкою (використовували центрифужні пробірки з кришками). Даний розчин інкубували 10 хв. при температурі $37,5^\circ\text{C}$ в термостаті. До реакційної суміші після інкубації додавали 2,5 мл дистильованої води, 0,5 мл 20 мМ N,N-DPD та 0,5 мл 30 мМ FeCl_3 . Після додавання реагентів закручували кришки. Реакційну суміш інкубували 10 хв в темряві, в холодильнику за

температури 4°C. Інкубовану суміш центрифугували 5 хв. при 1,5 тис. обертів за хвилину. Отриманий супернатант використовували для подальшого вимірювання в ньому концентрації сульфідів, яке проводили на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 670 нм. Для осадження білку перед вимірюваннями до супернатанту додавали 1 мл 10% трихлороцтової кислоти і центрифугували [131].

2.8. Біохімічні методи

Активність NO-синтаз (кальцій-залежної або конститутивної та кальцій-незалежної, або індукцйбельної) визначали по утворенню цитруліну, використовуючи класичний метод [132] та сучасну його модифікацію [133], пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції L-цитруліну. Для визначення загальної активності NO-синтаз (конститутивної + індукцйбельної) аліквоти суспензії мітохондрій та плазми крові, що містили 500-1000 мкг білка інкубували в загальному об'ємі 1 мл субстратної суміші такого складу (мкмоль/мл); K_2HPO_4 – 50, MgCl_2 – 1, CaCl_2 – 2, НАДФН – 1, L-аргінін – 2, рН 7,0 протягом 60 хв 37°C. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2N HClO_4 . Контролем були проби, що містили повну субстратну суміш і попередньо денатурований 2N HClO_4 білок. В подальшому суміш центрифугували при 3500 об/хв протягом 10 хв і в безбілковому супернатанті визначали вміст L-цитруліну спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з антипірином. Чутливість методу – 0,2 мкг L-цитруліну у 1 мл, завдяки чому цей метод може використовуватися для дослідження активності NO-синтаз, замінюючи загальноновживаний радіоактивний метод з використанням радіоактивного L-аргініну.

Визначення активності iNOS. Методика визначення аналогічна до попередньої з однією відмінністю: для визначення активності кальцій-незалежної NOS в інкубаційну суміш замість CaCl_2 добавляли 2 мкмоль ЕДТА.

Розрахунок сумарної конститутивної активності. Сумарна активність cNOS (eNOS+nNOS) вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS індукцибельну NO-синтазу. Активність ферментів виражали в пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв в розрахунку на 1 мг загального білка в пробі.

Визначення вмісту цитруліну. Цитрулін визначали високочутливим колориметричним методом [134]. Безбілкові аліквоти проб змішували з 2 мл реагента (1 мл 59мМ диацетилмонооксиму ("Sigma", США), 1 мл 32 мМ антипірину ("Sigma", США) і 55 мкМ сульфату заліза (II) в 6 N H_2SO_4), кип'ятили протягом 15 хв на водяній бані, після охолодження визначали величину екстинції при 465 нм. Кількість цитруліну визначали за допомогою калібрувального графіку з використанням L-цитруліну (х.ч.).

Визначення швидкості утворення $\text{O}_2^{\bullet-}$. Швидкість утворення супероксиду визначали за відновленням цитохрому С [135, 136]. Відновлення цитохрому С реєстрували спектрофотометрично за ростом поглинання при довжині хвилі 550 нм. Для підвищення специфічності вимірювання супероксиду (цитохром С здатні відновлювати також аскорбінова кислота, глутатіон, клітинні редуктази) цитохром С частково ацетилювали, що зменшувало швидкість його відновлення мітохондріальними і мікросомальними редуктазами і швидкість окиснення цитохром С-оксидазой, при цьому здатність цитохрому С відновлюватись супероксидом зберігалась.

Визначення швидкості утворення $\bullet\text{OH}$ - радикалу. До аліквот проб додавали суміш, яка містить 20 мМ дезоксирибози (ч.д.а.), 1мМ H_2O_2 ("Sigma", США), 20 мМ фосфату калію і 20 нг цинку у загальному об'ємі 0,6

мл. Після інкубації протягом 1 год при температурі 37°C додавали 0,5 мл 1% розчину тіобірбітуратової кислоти (ч.д.а.) з 50 мМ NaOH (ч.д.а.) і 0,5 мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти (ч.д.а.). Отриману суміш нагрівали при 100°C протягом 20 хв. Швидкість утворення •ОН-радикалу визначали за ростом поглинання при довжині хвилі 532 нм [137].

Визначення вмісту дієнових кон'югатів (ДК). Вміст ДК визначали спектрофотометрично за поглинанням при 232 нм гептанових екстрактів проб по методу [138].

Визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА). До аліквот проб додавали 0,5 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ NaOH і 0,5 мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв на киплячій водяній бані, охолоджували і визначали величину екстинції при 532 нм [139].

2.9. Статистична обробка експериментальних результатів

Отримані дані обробляли статистично з використанням програми Excell 2010 (MS Office XP), та Origin 7.0 фірми «Microcal Software Inc.» (США). Порівняння груп проводили за критерієм Стюдента для параметричної вибірки та Манна-Уїтні для непараметричної вибірки.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. ВПЛИВ ПРИГНІЧЕННЯ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ШЛЯХУ СИНТЕЗУ СІРКОВОДНЮ НА СКОРОТЛИВУ ФУНКЦІЮ СЕРЦЯ ТА РІВЕНЬ ОКИСНОГО СТРЕСУ

Після того, як у 1996 році двома японськими вченими були показані ефекти сірководню у нервовій системі, зокрема модуляція ним N-метил-D-аспартатних рецепторів, почалося активне дослідження його ендогенного синтезу та функцій в організмі [72]. Пізніше стало відомо про регуляторну роль H_2S в серцево-судинній системі, проте всі дослідження проводилися з використанням екзогенних донорів. Головним ферментом синтезу H_2S в серці та судинах донедавна вважався CSE, експресія гена якого значно вища у тканинах серця та судин ніж CBS. Однак, віднедавна показано, що важливу роль у коронарних артеріях серця відіграє сірководень, утворений третім ферментом, а саме 3-MPST [7]. До того ж відомо, що останній локалізується не лише в цитозолі клітин, а й в мітохондріях, що свідчить, ймовірно, про фізіологічну роль сірководню в цих органелах.

Застосувавши інгібітор ферменту 3-MPST O-СМН *in vivo* у дозі 50 мг/кг, за 30 хв до декапітації виявили зниження вмісту H_2S не лише в мітохондріях, а й у плазмі крові дослідних тварин (рис. 3.1, а, б) на 25 та 45 % відповідно. Таким чином перевірили ефективність обраного інгібітора та його адекватність для застосування у наших дослідженнях. Фермент 3-MPST знаходиться як в мітохондріях, так і в цитоплазмі клітин. У плазму крові сірководень, йовірніше за все, потрапляє з цитоплазми ендотеліальних клітин судин. І хоча ми говоримо про фермент 3-MPST як про мітохондріальний, зниження вмісту сірководню у плазмі крові внаслідок введення інгібітора

свідчить і про важливу роль цього ензиму для синтезу H_2S загалом, а не лише в мітохондріях. Отже, ми відтворили модель часткового дефіциту ендogenous синтезу, що подібно до стану при старінні.

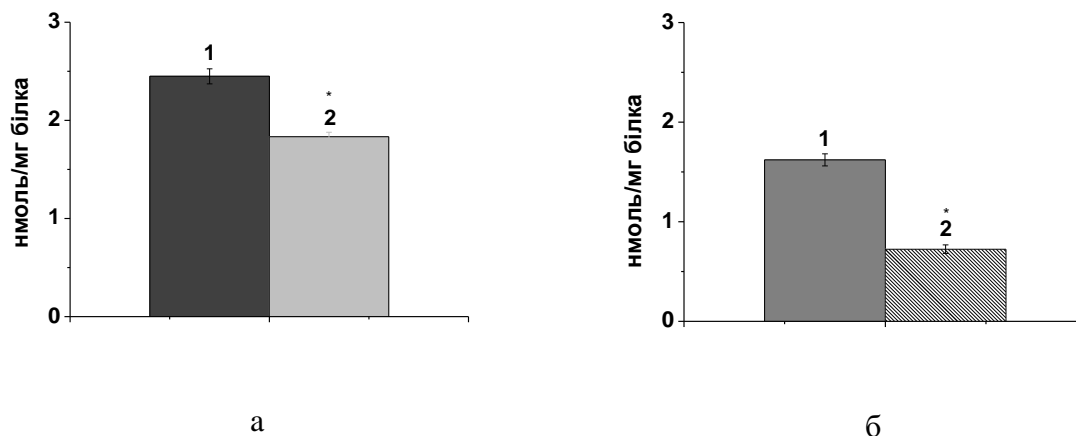


Рис. 3.1. Вміст H_2S в мітохондріях серця (а) та плазмі крові (б) контрольних (1) та дослідних (2) щурів

Застосування інгібітора О-СМН *in vivo* мало також негативний вплив на показники кардіодинаміки ізольованого серця дорослих щурів (таблиця). Так, удвічі знижувалися тиск у лівому шлуночку (Рлшл) та швидкість скорочення і розслаблення (dp/dt) міокарда, а коронарний потік зменшувався на 11,8 %. Спостережувані зміни були вірогідними. Незважаючи на те, що значення ЧСС мали тенденцію до зростання, робота серця (ІСФ) у тварин після введення блокатора 3-MPST залишалася вдвічі нижчою, ніж в інтактних щурів.

Таблиця. Вплив інгібітора ферменту 3-меркаптопіруватсульфуртрансфери на показники кардіодинаміки ізольованого серця щурів ($M \pm m$)

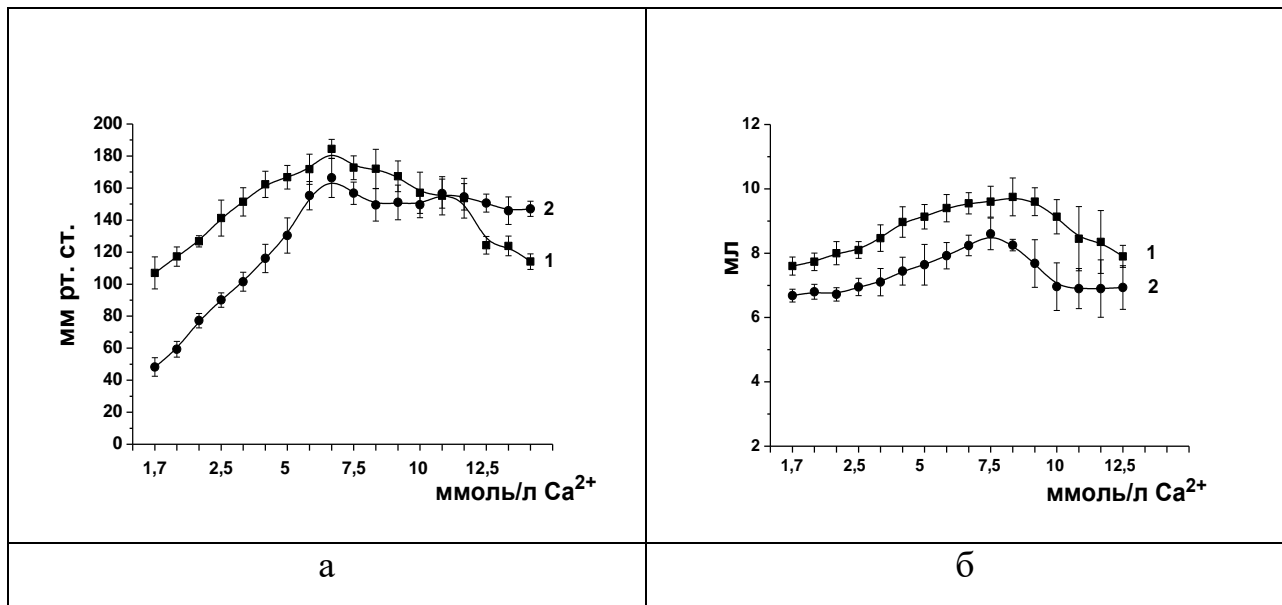
Показник	Контроль (n=6)	О-карбоксиметил- гідроксиламін (n=5)
----------	-------------------	--

Тиск у лівому шлуночку, мм рт. ст.	107 ± 10	48 ± 6**
Максимальна швидкість скорочення, мм рт. ст./с	2043 ± 194	968 ± 107*
Максимальна швидкість розслаблення, мм рт. ст./с	1887 ± 202	920 ± 115*
Коронарний потік, мл/хв	7,6 ± 0,3	6,7 ± 0,2*
Частота серцевих скорочень хв ⁻¹	200 ± 13	217 ± 13
Інтенсивність скоротливої функції, мм рт. ст. хв. ⁻¹	22434 ± 3021	11671 ± 1754*

*P<0,05, ** P<0,01 відносно контролю

Відомо, що такий патологічний процес, як серцева недостатність характеризується зниженням насосної функції серця та дефектами спряження процесу збудження-скорочення в результаті окисного стресу та порушення гомеостазу кальцію в кардіоміоцитах. Також з'ясовано, що за серцевої недостатності підвищується концентрація Ca²⁺ в клітинах, що призводить до посиленого входу катіона в мітохондрії, відкриття МП, розсіювання мітохондріального мембранного потенціалу, порушення роботи дихального ланцюга та зниження вмісту АТФ. Раніше нами було показано, що екзогенне введення донора сірководню (NaHS) має позитивний ефект на гетерометричну регуляцію роботи ізольованого серця щурів, а також запобігає розвитку реперфузійних порушень скоротливої активності міокарда, що пов'язано з його переваженням кальцієм [140]. Крім того було виявлено, що однією з мішеней кардіопротекторної дії донора сірководню є МП [141], яка бере участь у запуску апоптозу/некрозу і розвитку різноманітних захворювань серцево-судинної системи [142]. Це спонукало нас зробити висновок про регуляторний вплив сірководню на кальцієвий обмін у клітинах кардіоміоцитів.

Послідовно збільшуючи концентрацію CaCl_2 у перфузійному розчині, і, відтворюючи, таким чином, модель кальцієвого навантаження, досліджували адаптаційні можливості міокарда у тварин з пригніченим синтезом сірководню. Показано, що серця дослідних тварин розвивали менш потужну реакцію, яка проявлялась у знижених значеннях $P_{\text{лшл}}$, скорочувальної активності, КП та ІСФ міокарда (рис. 3.2.). Також слід зазначити, що максимальна інотропна стимуляція серця у контрольних тварин спостерігалася у відповідь на додавання 7,5 ммоль/л CaCl_2 , тоді як у дослідних – при 5 ммоль/л CaCl_2 (див. рис. 3.2, г). Це свідчить про зниження функціональних резервів міокарда у тварин за умов пригнічення синтезу сірководню мітохондріальним ферментом.



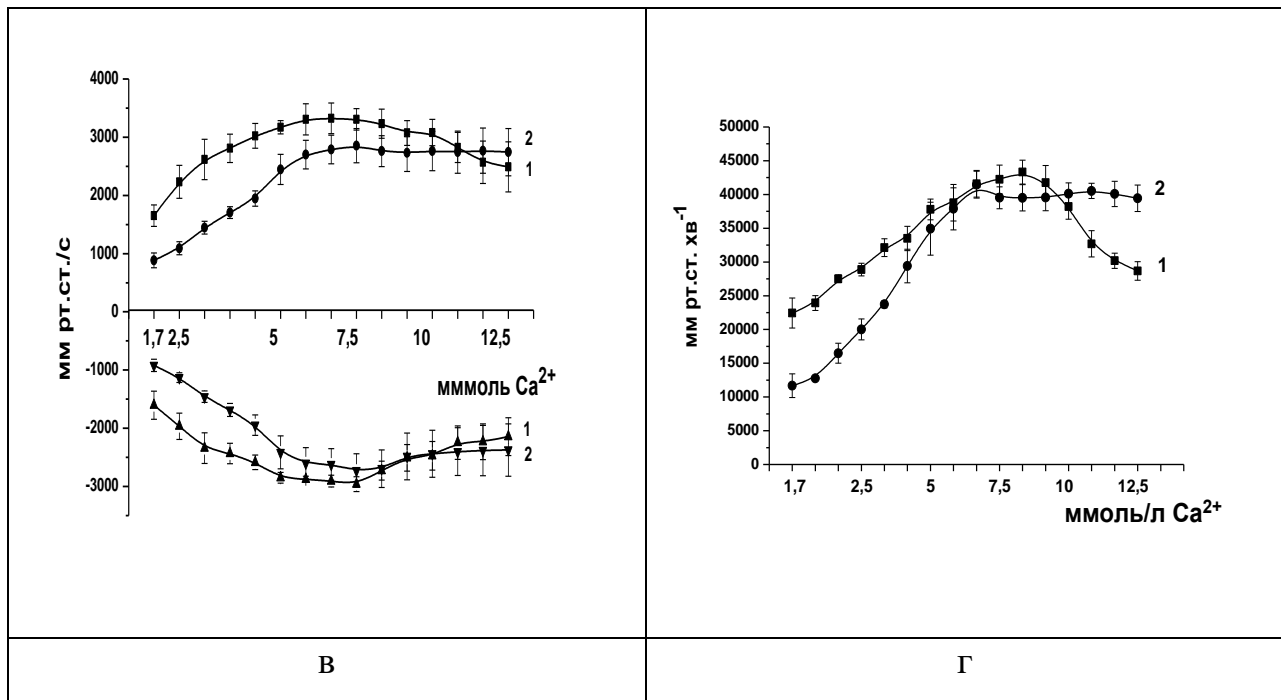


Рис. 3.2. Вплив О-СМН (50 мг/кг) на показники кардіодинаміки ізольованого серця щурів за умов збільшення концентрації кальцію у перфузійному розчині: а – тиск у лівому шлуночку; б – коронарний потік; в – швидкість скорочення міокарда dP/dt ; г – інтенсивність скоротливої функції ІСФ; 1 – контроль, 2 – дія О-СМН.

Як відомо, внаслідок перевантаження внутрішнього вмісту клітини кальцієм, його концентрація зростає у саркоплазматичному ретикулумі, цитоплазмі та мітохондріях. Це призводить до електричних та механічних порушень у роботі серця, зокрема до аритмій, зниження скоротливої функції, розвитку контрактур та післяконтрактур [143]. Водночас зниження скоротливої сили пов'язане зі зменшенням кількості високоенергетичних фосфатів. Таке зростання концентрації Ca^{2+} в клітинах серця може бути наслідком пролонгованої тахікардії, підвищеним вивільненням катехоламінів, порушенням функцій клітин (у результаті ішемії, гіпоксії, реперфузії, серцевої недостатності) тощо [143].

Отже, пригнічення синтезу сірководню в клітинах серця щура призводить до зниження здатності серця витримувати кальцієві навантаження. Оскільки раніше було показано, що за різних патологічних станів, зокрема при старінні та гіпертензії, вміст H_2S в тканинах серця та мітохондріях знижується, то відтак серце стає більш чутливим до ішемічно-реперфузійного пошкодження [144].

Відомо, що сірководень має антиоксидантні властивості. Тому зниження його вмісту в тканинах та крові ймовірно впливає на рівень АФК та АФА. Функціональним проявом H_2S у серцево-судинній системі є підвищення активності антиоксидантних ферментів Mn- та CuZn-супероксиддисмутаза, а також пряме захоплення АФК у клітинах кардіоміоцитів під час ішемії-реперфузії [3]. Виявили, що у дослідних тварин швидкість генерації $\cdot O_2^-$ та $\cdot OH$ -радикалів зростала як в мітохондріях, так і в плазмі крові, що свідчить про інтенсифікацію процесів утворення вільних радикалів (рис. 3.3. а, б) [145].

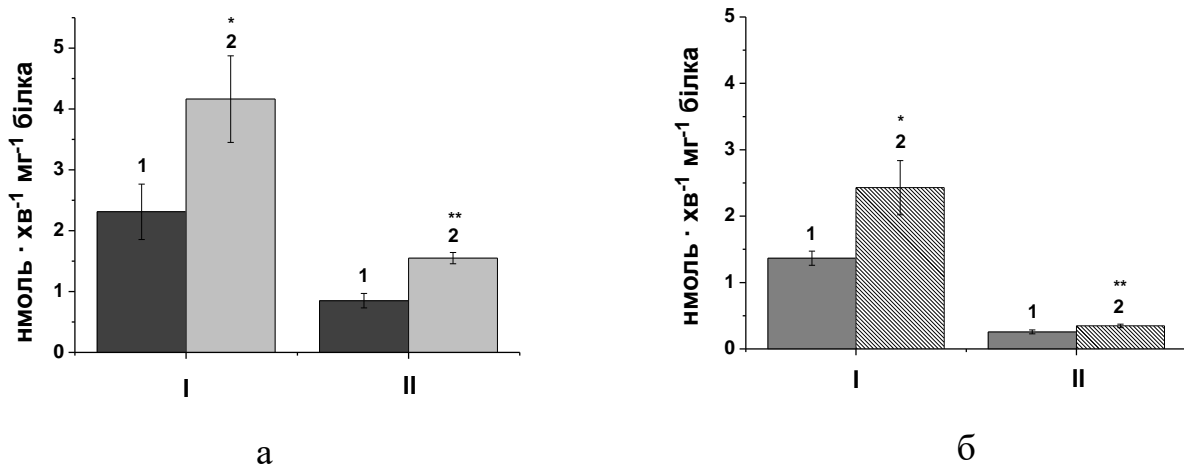


Рис. 3.3. Значення показників окисного стресу у мітохондріях серця та плазмі крові контрольних (1) та дослідних (2) щурів: швидкість генерації

супероксидного (I) та гідроксильного (II) радикалів у мітохондріях (а) та плазмі крові (б)

Підвищення вмісту супероксидного радикала, яке супроводжується значним утворенням NO (за допомогою iNOS), призводить до зростання продукції пероксинітриту – надзвичайно потужного окисника. У наших дослідженнях показано, що пригнічення *in vivo* синтезу сірководню спричиняє достовірне зниження активності роботи cNOS у мітохондріях (mtNOS) та в плазмі крові на 20,4 та 24,6 % відповідно (рис. 3.4 а, б). При цьому активність індукційного синтезу NO в органелах зростає у 3,27 раза, що свідчить про значне підвищення утворення NO, який, ймовірно, надалі бере участь у синтезі пероксинітриту.

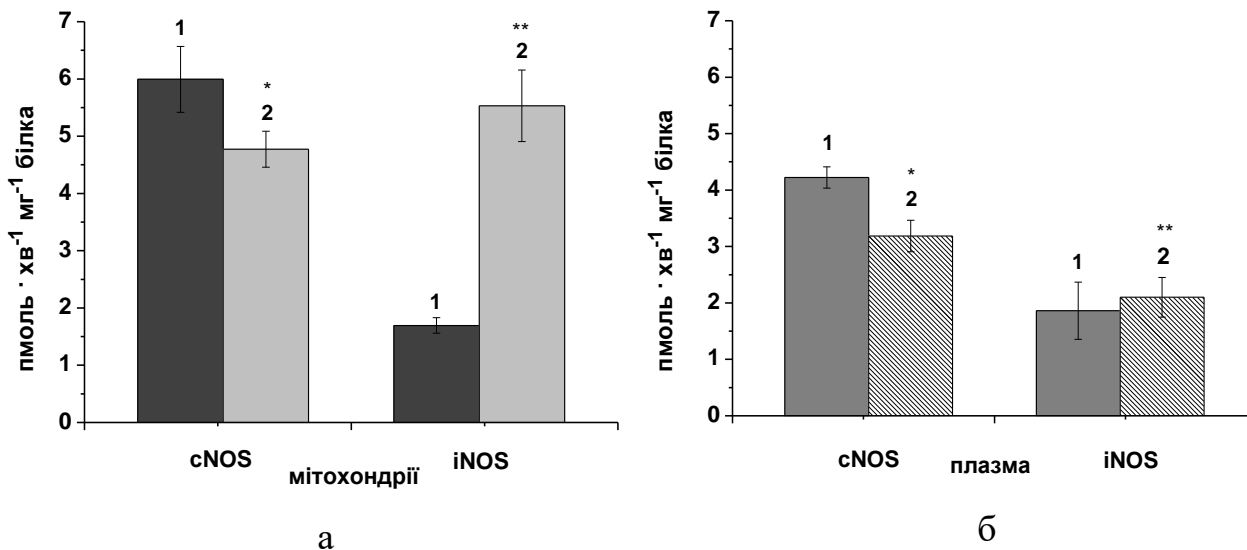


Рис. 3.4. Активність ферментів *de novo* синтезу NO, а саме конститутивної (cNOS) та індукційної (iNOS) NO-синтаз в мітохондріях серця (а) та плазмі крові (б) контрольних (1) та дослідних (2) щурів відповідно

Відомо, що одним із механізмів дії сірководню як антиоксиданта є зниження перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) через зв'язування H_2O_2 та супероксидного радикала у моделі ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда [76]. Також показано, що активація сірководнем Nrf2-залежного шляху призводить до підвищення експресії генів гемоксигенази (НО-1), глутатіонредуктази, глутатіон-S-трансферази, тіоредоксину та каталази, які відіграють важливу роль в антиоксидантній системі захисту, а також його інгібувальний вплив на фосфодіестеразу-5 та пряму дію як скавенджера цитотоксичного пероксинітриду [3]. У наших дослідженнях інтенсивність ПОЛ оцінювали за зміною вмісту первинних продуктів окиснення – ДК та кінцевого продукту – МДА. Виявили, що незважаючи на відсутність достовірної різниці між вмістом продуктів ПОЛ у мітохондріях, у плазмі крові їх вміст вірогідно зростає, що вказує на інтенсифікацію цього процесу (рис. 3.5, а, б).

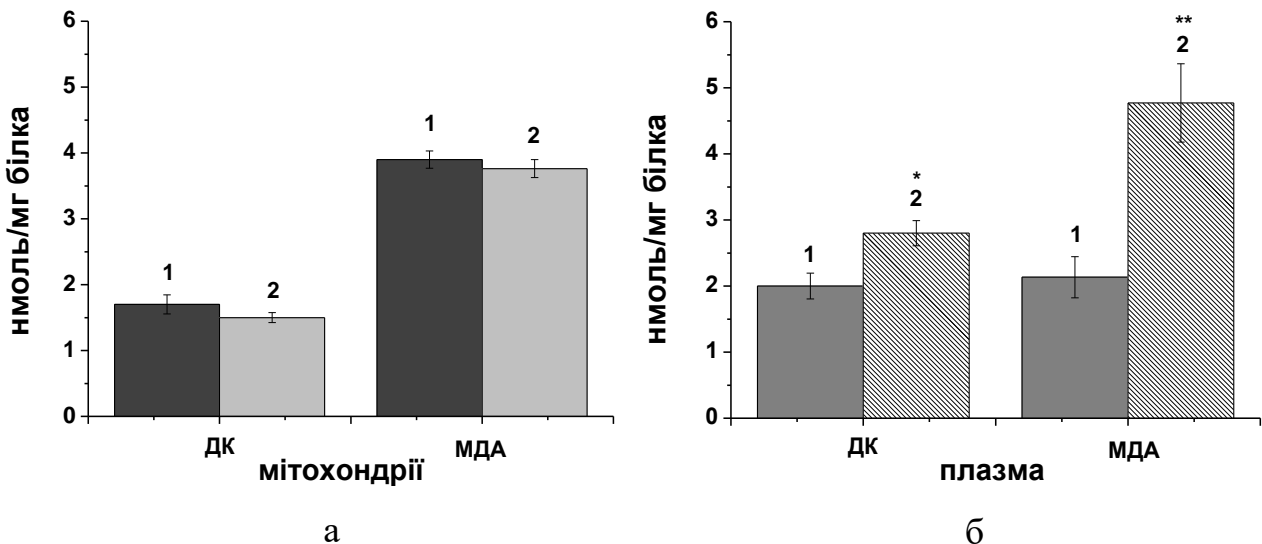


Рис. 3.5. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів (ДК) та малонового диальдегіда (МДА) в мітохондріях серця (а) та плазмі крові (б) контрольних (1) та дослідних (2) щурів

Таким чином показано, що пригнічення ендogenous синтезу сірководню в мітохондріях призводило до зростання таких показників окисного стресу, як $\cdot\text{O}$ та $\text{OH}\cdot$ -радикалів, підвищення ПОЛ і збільшення активності індукцйбельного синтезу NOS на тлі зменшення функціональної активності cNOS як в мітохондріях серця (mtNOS), так і в плазмі крові дослідних щурів.

3.2. НАКОПИЧЕННЯ Ca^{2+} У МІТОХОНДРІЯХ СЕРЦЯ ДОРОСЛИХ ТА СТАРИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПІДТРИМАННЯ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ПОТЕНЦІАЛУ

3.2.1. Акумуляція кальцію в ізольованих мітохондріях серця дорослих тварин

Мітохондрії кардіоміоцитів відіграють важливу роль в регуляції життя та смерті клітин серця. Вони є основними постачальниками АТФ, яка необхідна для роботи серцевого м'язу та регулюють процес запрограмованої клітинної смерті (відповідають за вихід цитохрому *c* і протеїнів, які індукують апоптоз, а також протеїнів, котрі нейтралізують ендogenous інгібітори апоптозу (SMAC/DIABLO).

Разом з ендoplазматичним ретикулумом мітохондрії відповідають за кальцієвий гомеостаз клітин, оскільки здатні накопичувати цей катіон. Більше того, Ca^{2+} в мітохондріях стимулює окисне фосфорилування, що включає алостеричну активацію піруват-, ізоцитрат- та α -кетоглутаратдегідрогеназ, а

також стимуляцію АТФ-синтази, α -гліцеролфосфатдегідрогенази і аденіннуклеотидтранслокази (АНТ) [9]. Загалом, зростання вмісту внутрішньомітохондріального кальцію активує роботу електронно-транспортного ланцюга і, як наслідок, утворення АТФ. Наприклад, β -адренергічна стимуляція кардіоміоцитів потребує посилення скорочення серцевого м'яза. Підвищення вмісту кальцію в мітохондріях забезпечує утворення необхідної кількості АТФ для збільшення сили скорочення [146].

Відомо, що сірководень регулює деякі процеси в мітохондріях, зокрема у високих концентраціях інгібує цитохром-с-оксидазу, і так би мовити, зворотно пригнічує роботу органел, захищаючи, таким чином, кардіоміоцити від ішемічно-реперфузійного пошкодження, а також виступає донором електронів для роботи електронно-транспортного ланцюга при гіпоксії [84, 115]. Проте мало відомо про регуляцію ним кальцієвого гомеостазу в мітохондріях.

Наразі для дослідження вмісту кальцію у мітохондріях та його внутрішньоклітинного обміну застосовують різні методи, зокрема Ca^{2+} -селективні електроди, ізотопну техніку ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), двопроменеву спектрофлуориметрію з використанням кальційчутливих металохромних барвників (арсеназо), конфокальну мікроскопію, де як зонди використовують біолоюмінесцентні акварини, флуоресцентні протеїни та низькомолекулярні кальційфлуоресцентні індикатори [147]. У сучасній літературі [147, 148] доводиться можливість використання протокової цитофлуориметрії для дослідження метаболізму кальцію в ізольованих мітохондріях.

Створений попередньо робочий протокол [147, 149] дав змогу здійснювати дослідження в ділянці, де 95 % подій, які реєстрував прилад були мітохондріального походження (рис. 3.6, а). Для цього було введено два «логічних обмеження» для відокремлення лише сигналу з мітохондрій,

оскільки суспензія органел могла містити немітохондріальні домішки. Введення першого «логічного обмеження» – за показником прямого світлорозсіювання (вісь абсцис – FS Log) проти бічного світлорозсіювання (вісь ординат – SS Log) дало можливість не реєструвати ушкодженні клітинні структури під час дослідження. Друге «логічне обмеження» було застосовано за параметром флуоресцентного сигналу від акридин-оранж-10-ноніл бромід-позитивних частинок (NAO-позитивних). Використання NAO у концентрації 100 нмоль/л дає змогу виявити саме мітохондріальний сигнал, оскільки барвник зв'язується з кардіоліпіном – специфічним фосфоліпідом внутрішньої мембрани мітохондрій. Наявність флуоресцентного сигналу (див. рис. 3.6., б, крива 1) свідчить про зв'язування барвника з вільним Ca^{2+} у матриксі мітохондрій, а його зміщення вправо (див. рис. 3.6. б, крива 2) – про акумуляцію іонів ізольованими мітохондріями.

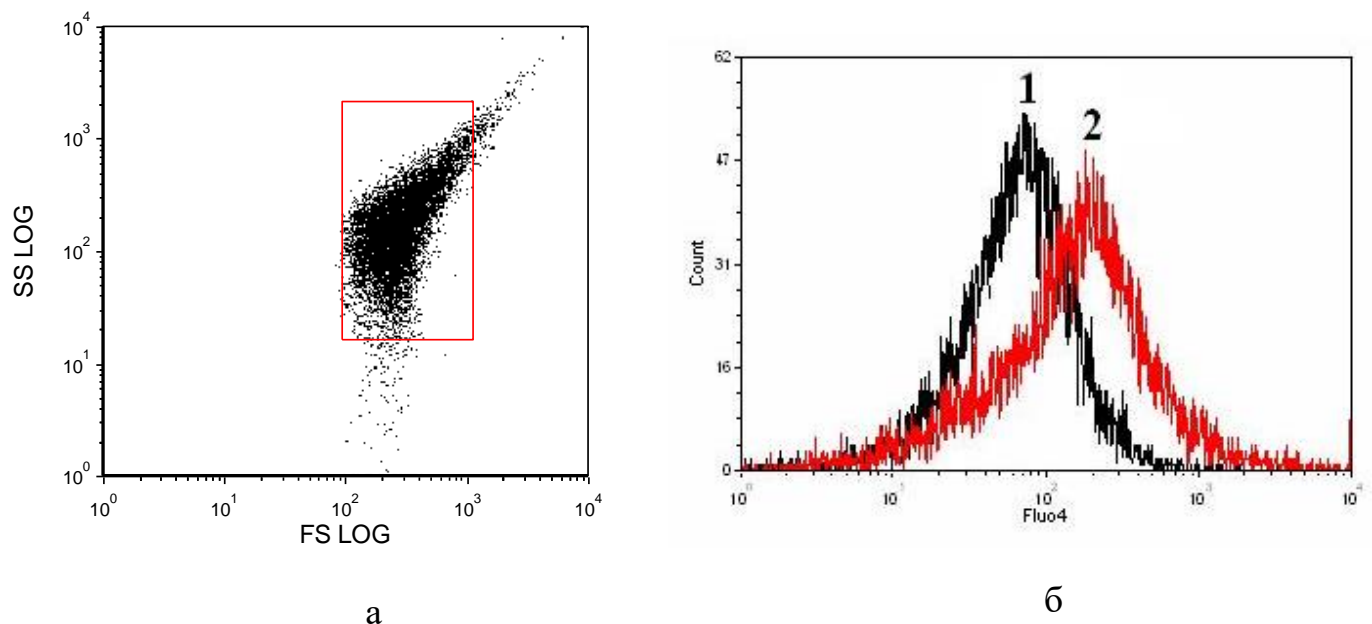


Рис. 3.6. Характеристика препарату мітохондрій на протоковому цитофлуориметрі: а – виділена ділянка дослідження; б – типові криві накопичення Ca^{2+} мітохондріями кардіоміоцитів: 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} у

концентрації 100 мкмоль/л; за віссю абсцис – інтенсивність флуоресценції, за віссю ординат – кількість подій, зареєстрованих приладом.

При дослідженні накопичення Ca^{2+} ізольованими мітохондріями серця дорослих щурів, з використанням зонда Fluo-4 AM підбирали такі умови, за яких підтримувався і фіксувався мітохондріальний потенціал. У літературі описано, що навантаження клітин зондом у концентрації 2-10 мкмоль/л може здійснюватися протягом 30-45 хв при 4, 22, 30 або 37 °С [149]. Оскільки об'єктом нашого дослідження є мітохондрії кардіоміоцитів ми намагалися підібрати оптимальні умови навантаження Fluo-4 AM. Використовували барвник у концентрації 2,5 мкмоль/л протягом 30 хв за різних температур, зокрема 37, 26 і 22°С. Високу інтенсивність сигналу флуоресцентного зонда в енергізованих мітохондріях реєстрували за наявності іонів Ca^{2+} при навантаженні мітохондрій маркером протягом 30 хв при 26°С (рис. 3.7) [150].

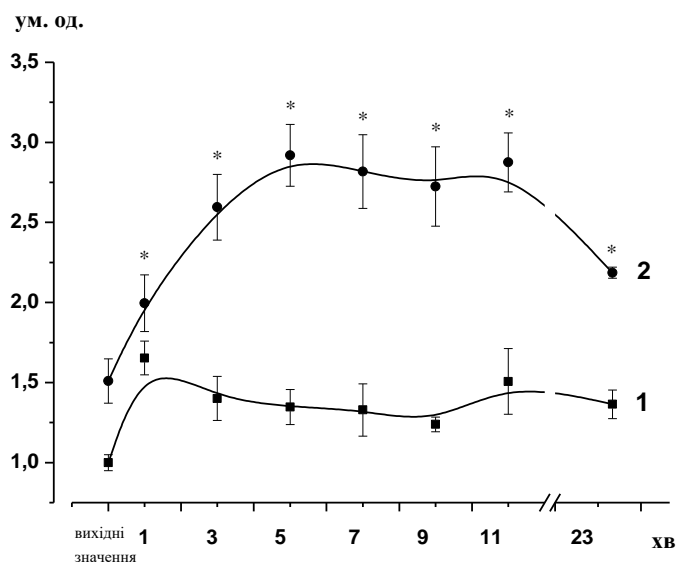


Рис. 3.7. Зміна інтенсивності флуоресценції кальційчутливого зонду Fluo-4 AM у мітохондріях серця щурів за наявності у середовищі інкубації Ca^{2+}

(100 мкмоль/л) і комплексу Mg^{2+} -АТФ (3 ммоль/л). Навантаження зондом відбувалося протягом 30 хв: 1 – при 37°C (n=5); 2 – при 26°C (n=15). *P<0,05 відносно вихідного значення

Помітили, що при навантаженні мітохондрій зондом протягом 30 хв при 37°C інтенсивність флуоресценції була значно нижчою порівняно зі значеннями в цей час при 26°C (див. рис. 3.7). Зменшення температури навантаження до 22°C знижувало інтенсивність флуоресценції, ймовірно, внаслідок зменшення активності роботи внутрішньомітохондріальних естераз, які перетворюють зонд в активну форму, і в результаті відсутності достатньої кількості барвника в органелах.

Оскільки основним шляхом надходження кальцію у мітохондрії є мітохондріальний кальцієвий уніпортер (МКУ), робота якого залежить від потенціалу на внутрішній мембрані органел, припустили, що зниження акумуляції Ca^{2+} органелами, які навантажувалися барвником при 37°C може бути пов'язане з деполяризацією їхньої мембрани під час такого режиму. Адже відомо, що деполяризація мітохондріальної мембрани роз'єднувачами FCCP, CCCP окремо або в комбінації з інгібітором F_1F_0 АТФ-синтази олігоміцином призводить до інгібування входу Ca^{2+} через уніпортер внаслідок елімінації електричної рушійної сили (потенціалу) [9]. Тому ми дослідили мембранний потенціал ізольованих мітохондрій серця щурів і, як видно з рис. 3, він знижується після 30-хвилинної інкубації як при 26°C, так і 37°C. Проте за вищої температури падіння потенціалу є більш значним і становить 65 мВ, що й зумовлює зниження накопичення кальцію органелами.

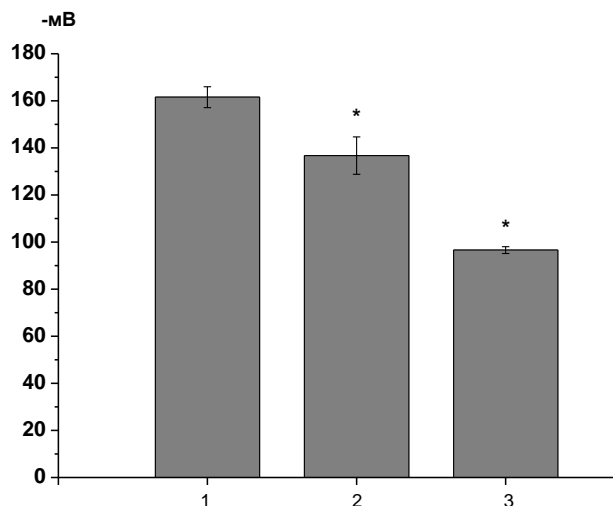


Рис. 3.8. Вплив температури на потенціал мітохондрій, інкубованих протягом 20 хв: 1 – на льоду (контроль); 2 – 30 хв при 26°C; 3 – 30 хв при 37°C. *P<0,05 відносно контролю (n=5)

Тобто ми припускаємо, що зменшення інтенсивності флуоресценції в мітохондріях, які навантажувалися флуоресцентним зондом протягом 30 хв при 37°C, пов'язане зі зниженням мітохондріального потенціалу і погіршенням Ca²⁺-транспортувальної здатності уніпортера. Враховуючи дані літератури та отримані результати, навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2,5 мкмоль/л у наступних експериментах проводили при 26°C протягом 30 хв.

Відомо, що мітохондріальний уніпортер регулюється низкою інгібіторів і активаторів. Найбільш відомими інгібіторами МКУ є сполуки рутенію, зокрема рутеній червоний (RuRed) та Ru360. У дослідженні було використано рутеній червоний – гексавалентний полікатіонний барвник, неспецифічний інгібітор транспорту кальцію у мітохондрії у концентрації 10⁻⁵ моль/л. Ця сполука попереджає вхід катіона через МКУ, ріанодинові рецептори та швидкий режим входу Ca²⁺ (від англ. rapid uptake mode, RaM). На рис. 3.9.

представлено криві накопичення Ca^{2+} у концентрації 100 мкмоль/л, без впливу інгібітора (крива 1) та під час інкубації мітохондрій протягом 3 хв з RuRed (крива 2). Чітко видно, що за попередньої дії інгібітора входу Ca^{2+} , інтенсивність флуоресценції знижується на 5-й хвилині на 89%, що свідчить про відсутність акумуляції іонів кальцію ізольованими органелами.

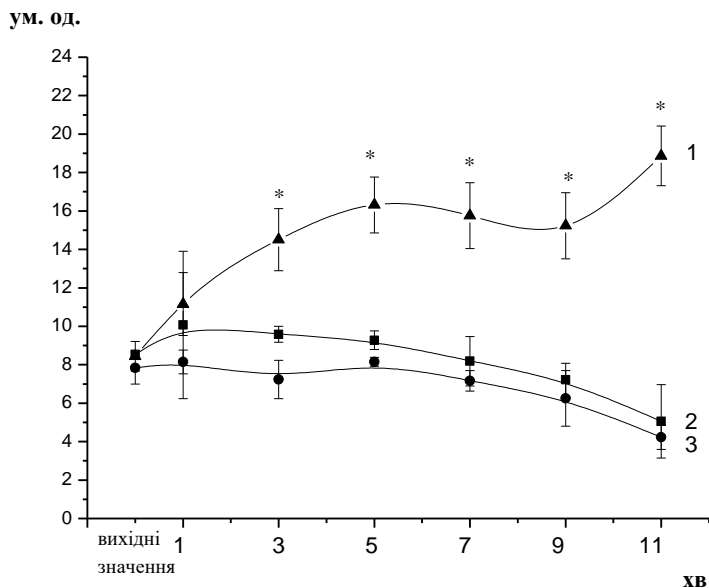


Рис. 3.9. Зміна інтенсивності флуоресценції зонду Fluo-4 AM у мітохондріях серця щурів за наявності в середовищі інкубації 100 мкмоль/л Ca^{2+} : 1 – преінкубація з Mg^{2+} -АТФ (3 ммоль/л), дія Ca^{2+} (n=15); 2 – преінкубація протягом 3 хв з рутенієм червоним (10^{-5} моль/л), дія Ca^{2+} (n=5); 3 – дія Ca^{2+} за відсутності Mg^{2+} -АТФ у середовищі (n=5). *P<0,05 відносно вихідного значення

Ми також встановили, що накопичення Ca^{2+} мітохондріями клітин серця відбувається за наявності комплексу Mg^{2+} -АТФ у концентрації 3 ммоль/л (див. рис. 3.9.). На ізольованих мітохондріях клітин гладеньких м'язів матки було показано, що відсутність у середовищі інкубації MgCl_2 і АТФ при додаванні

100 мкмоль/л Ca^{2+} спричиняє деполяризацію мітохондріальної мембрани, що призводить до нездатності мітохондрій акумулювати Ca^{2+} [147]. Слід відмітити, що інтенсивність флуоресценції зонда Fluo-4 АМ вища, якщо в середовищі інкубації містяться вищезгадані субстрати (див. рис. 3.9., крива 1). В наших умовах дослідження за відсутності комплексу Mg^{2+} -АТФ акумуляція Ca^{2+} в мітохондріях не спостерігалася (див. рис. 3.9., крива 3), що свідчить про енергозалежність цього процесу. Отже, для акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях кардіоміоцитів необхідні сполуки Mg^{2+} і АТФ.

Вивчали накопичення різних концентрацій кальцію ізольованими мітохондріями. Показали, що найбільш ефективно процес акумуляції відбувався при дії $5 \cdot 10^{-5}$ і 10^{-4} моль/л (рис. 3.10). Тому в подальших дослідженнях використовували 10^{-4} моль/л Ca^{2+} .

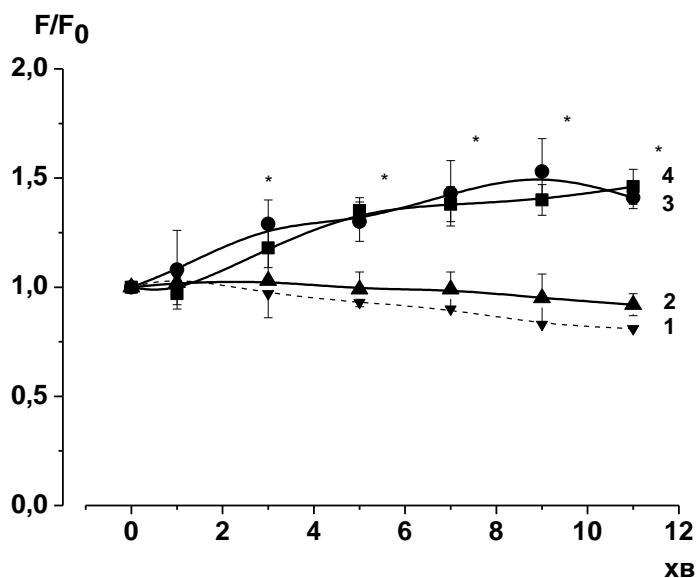


Рис. 3.10 Накопичення Ca^{2+} мітохондріями серця шурів в середовищі інкубації, без додавання катіона (1), а також за дії Ca^{2+} у концентраціях 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ і 10^{-4} моль/л (2, 3, 4 відповідно). * $P \leq 0,05$ відносно значень у безкальцієвому середовищі

Таким чином, була ідентифікована кальційакумулювальна здатність ізольованих мітохондрій серця дорослих щурів і досліджені деякі її властивості за фізіологічних умов. Продемонстровано можливість застосування методу протокової цитофлуориметрії для вивчення кальцієвого гомеостазу ізольованих мітохондрій кардіоміоцитів і встановлено оптимальні умови процесу акумуляції, а саме залежність від температури інкубації, коли підтримується мітохондріальний потенціал і наявності субстрату комплексу Mg^{2+} -АТФ, а також сукцинату. З'ясовано, що накопичення іонів кальцію чутливе до інгібітора МКУ – рутенію червоного, що свідчить про основну роль цієї транспортувальної системи в процесі акумуляції. Нами показано, що ізольовані мітохондрії серця мають обмежену здатність накопичувати кальцій.

3.2.2. Накопичення кальцію в ізольованих мітохондріях з тканини серця старих щурів

Досліджували акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями ізольованими з серця старих тварин. Адже відомо, що старіння – це фізіологічний процес, який характеризується змінами біохімічних процесів, зниженням активності ферментів, накопиченням АФК тощо. Старіння характеризується прогресивною втратою функцій органами, що призводить до розвитку дегенеративних розладів та виникнення апоптозу в клітинах [151, 152]. Деяко суперечливими є дані щодо функціонування дихального ланцюга за умов фізіологічного старіння. Зокрема дослідники стверджують, що незважаючи на прогресуюче окиснення ліпідів, активність комплексів ЕТЛ органел з віком не змінюється [151]. Інші науковці спостерігають зниження ефективності роботи дихального ланцюга у щурів у разі старіння [153]. Також раніше нами було показано, що з віком чутливість МП до кальцію зростає [12]. Ми виявили, що накопичення Ca^{2+} мітохондріями серця старих тварин відбувається активніше

порівняно з дорослими. Так, у них максимальна флуоресценція барвника спостерігалася вже на 3-й хвилині і була вищою на 33 %, ніж у контрольних дорослих (рис. 3.11).

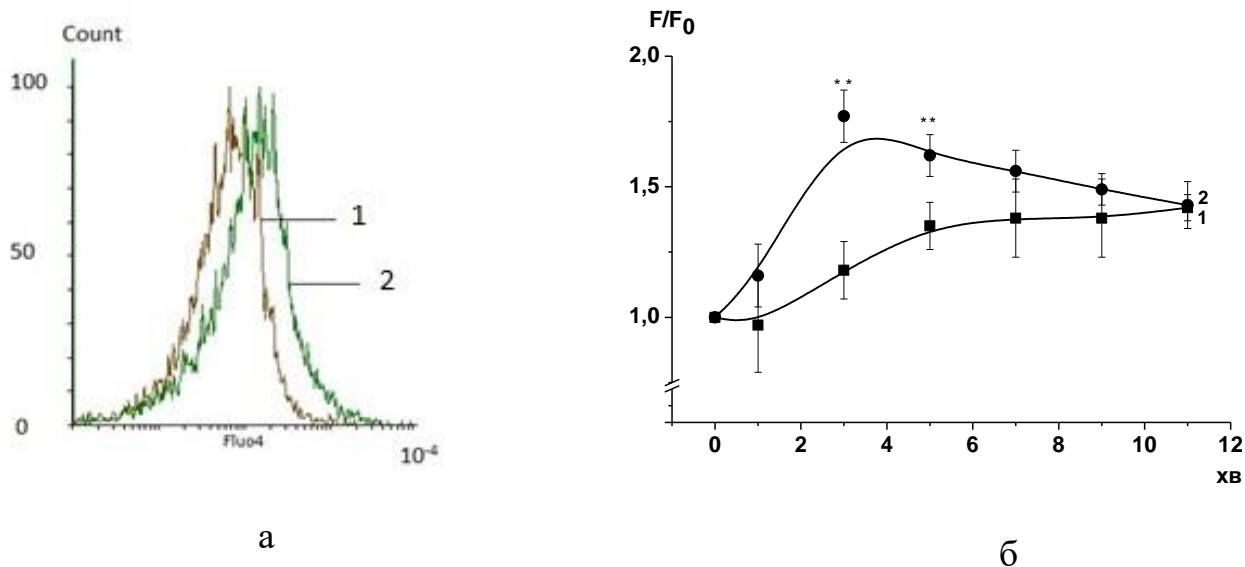


Рис. 3.11. Накопичення Ca^{2+} в мітохондріях серця дорослих (1) і старих (2) щурів: а – нативні криві накопичення Ca^{2+} мітохондріями; б – за наявності 10^{-4} моль/л Ca^{2+} у суспензії органел. $**P \leq 0,05$ відносно значень у дорослих щурів

Ймовірним механізмом підвищення входу катіона є окиснення структур мітохондріального уніпортера з віком, який є основним воротарем входу Ca^{2+} [154]. Основним транспортером кальцію в мітохондрії є електрофоретичний кальцієвий уніпортер (МКУ), робота якого залежить від мембранного потенціалу органел, який у нормі становить -180 мВ [17]. Як свідчать дані літератури, активність його роботи підвищується внаслідок окиснення АФК, вміст яких, як відомо, при старінні зростає [154]. Можливо, це один з механізмів підвищеної акумуляції кальцію органелами старих тварин, що у свою чергу збільшує ризик перевантаження ним мітохондрій [154]. Отримані

результати узгоджуються з даними наших попередніх досліджень, де було показано підвищену чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у старих тварин [12]. Ймовірною причиною є посилений вхід катіона через МКУ і його підвищений вміст в матриксі.

Для дослідження накопичення кальцію в мітохондріях серця старих щурів використовували розчин CaCl_2 у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} і 10^{-4} моль/л (рис. 3.12). Виявлено, що динаміка акумуляції іона залежала від його вмісту у середовищі. Так, внесення Ca^{2+} у концентрації 10^{-7} моль/л лише незначно підвищувало флуоресценцію кальційчутливого барвника на 1-й хвилині. При збільшенні концентрації до 10^{-5} моль/л накопичення було поступовим з виходом на плато на 5-й хвилині. Додавання $100 \text{ мкмоль/л Ca}^{2+}$ сприяло активній акумуляції катіона в органелах одразу з перших хвилин (максимум на 3-й хвилині) з подальшим зниженням флуоресценції, ймовірно через його вивільнення з мітохондрій внаслідок Ca^{2+} -індукованого відкриття МП (див. рис. 3.12, крива 2, 3, 4).

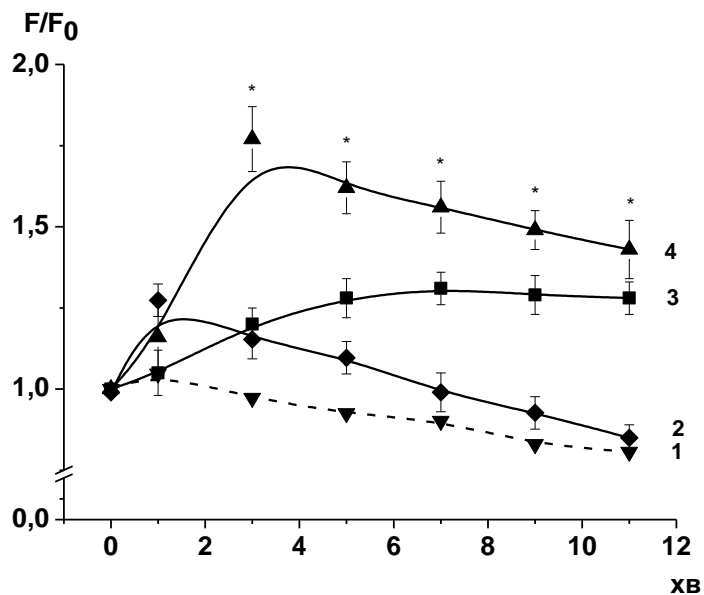


Рис. 3.12. Накопичення Ca^{2+} мітохондріями серця старих щурів у середовищі з різними концентраціями катіона: 1 – у середовищі без Ca^{2+} , 2, 3,

4 – за наявності катіона у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} , і 10^{-4} моль/л відповідно, * $P \leq 0,05$ відносно значень у середовищі з 10^{-7} моль/л Ca^{2+}

Отже, накопичення Ca^{2+} мітохондріями серця старих щурів відбувалося інтенсивніше в часі і з більшим значенням флуоресцентного сигналу, що характеризує акумуляційну здатність мітохондрій як компенсаторний прояв при порушеннях розподілу іона Ca^{2+} -транспортвальними системами органел і клітини загалом. Було з'ясовано, що акумуляція цього катіона у дорослих тварин відбувалася поступово з максимумом на 9-й хвилині, тоді як у старих максимальна флуоресценція барвника спостерігалася вже на 3-й хвилині і була вищою на 33 %.

3.3. ВПЛИВ СІРКОВОДНЮ НА НАКОПИЧЕННЯ КАЛЬЦІЮ В ІЗОЛЬОВАНИХ МІТОХОНДРІЯХ СЕРЦЯ ЩУРІВ

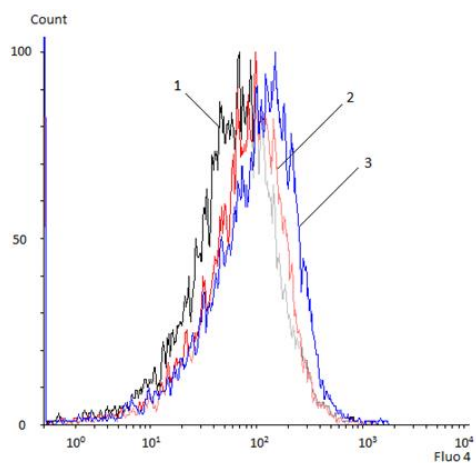
3.3.1. Акумуляція Ca^{2+} мітохондріями під впливом донора сірководню NaHS

Вплив екзогенного сірководню на акумуляцію кальцію в ізольованих мітохондріях вивчали, використовуючи розчинений у бідистильованій воді NaHS у діапазоні концентрацій від 10^{-7} до 10^{-4} моль/л. Вимірювання флуоресценції проводили до та через хвилину після внесення розчину NaHS, а також після додавання CaCl_2 у середовище інкубації на 1, 3, 5, 7, 9, 11-й хвилинах. Також використовували інгібітор мітохондріального ферменту синтезу сірководню о-карбоксиметилгідроксиламін (О-СМН) у концентрації 10^{-3} моль/л. Вміст білка у пробі становив 0,05 мг/мл.

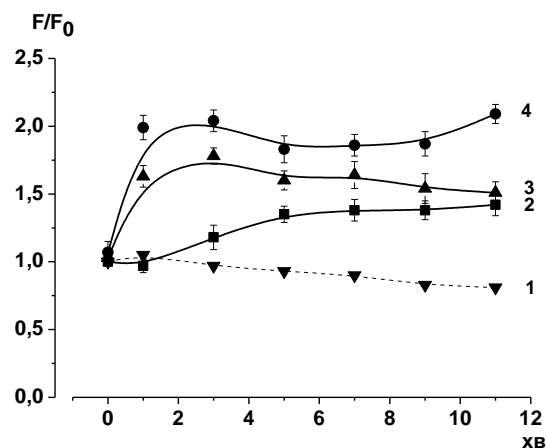
Вплив донора сірководню на накопичення кальцію у мітохондріях був неоднозначним (рис. 3.13. б). Так, у високій концентрації NaHS (10^{-4} моль/л)

частково пригнічував акумуляцію катіона, про що свідчить зниження флуоресценції на 25 % (не представлено на рисунку). Подібний ефект спостерігали і за дії 10^{-5} моль/л NaHS. [155]

Натомість преінкубація мітохондрій з 10^{-6} моль/л NaHS стимулювала вхід Ca^{2+} в ізольовані, навантажені цим катіоном мітохондрії (рис. 3.13, б, крива 3), в 1,68 рази на 1-й хвилині. Найбільш ефективно NaHS підвищував цей процес в органелах у концентрації 10^{-7} моль/л: інтенсивність флуоресценції підвищувалась в 2 рази (див. рис. 3.13, крива 4) [155]. Варто зазначити, що дія лише NaHS (10^{-7} моль/л) у середовищі, без додавання кальцію, не впливала на зміну цього показника.



а



б

Рис. 3.13. Вплив донора сірководню NaHS на акумуляцію кальцію у мітохондріях серця щурів: а - нативні криві інтенсивності флуоресценції Fluo-4 AM в мітохондріях без Ca^{2+} (1), при дії Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) (2) та з преінкубацією з NaHS протягом 1 хв (10^{-7} моль/л) на тлі дії Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) (3); б – криві накопичення в часі: 1 – середовище інкубації містить слідові

концентрації Ca^{2+} ; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – преінкубація з NaHS (10^{-6} моль/л) і дія Ca^{2+} ; 4 – преінкубація з NaHS (10^{-7} моль/л) і вплив Ca^{2+}

Отже, вплив донора сірководню на кальційакумулювальну здатність ізольованих мітохондрій був дозозалежним, при цьому NaHS у концентрації 10^{-7} моль/л найбільш ефективно сприяв входу Ca^{2+} в органели. Отриманий результат свідчить про участь H_2S в регуляції кальцієвого гомеостазу в клітинах серця, оскільки для розслаблення серцевого м'яза потрібно, щоб кальцій був вилучений з цитозолу, а мітохондрії належать до органел, які його депонують. Дані про те, що сірководень знижує перевантаження цитоплазми клітин судин і серця кальцієм, підтвержені також в інших дослідженнях [156].

Водночас активне надходження Ca^{2+} в мітохондрії може викликати відкриття МП – мегаканалу між внутрішньою і зовнішньою мітохондріальними мембранами. У попередніх дослідженнях нами було показано, що донор сірководню у концентраціях 10^{-6} – 10^{-5} моль/л пригнічував кальційіндуковане відкриття МП. До механізмів такого інгібувального впливу H_2S може належати як його безпосередній вплив на структурні елементи МП, так і активація мітохондріальних K_{ATP} -каналів та утворення NO , який у свою чергу також запобігає відкриттю МП [4]. Так, встановлено, що активація H_2S -синтезувальних ферментів у старих тварин сприяла відновленню конститутивного синтезу NO в тканинах серця та аорти [157], який є зниженим при старінні, що підтверджує взаємний регуляторний вплив газових трансмітерів один на одного та їхню функціональну взаємодію. Тобто зростання кальційакумулювальної здатності мітохондрій у результаті впливу NaHS може бути наслідком інгібування сірководнем МП, яка бере участь також і у фізіологічній регуляції вмісту катіона в органелах.

Також виявили, що NaHS посилює вхід катіона в органели у концентраціях 10^{-6} і 10^{-7} моль/л максимально на 14 і на 22 % відповідно і у старих тварин (рис. 3.14).

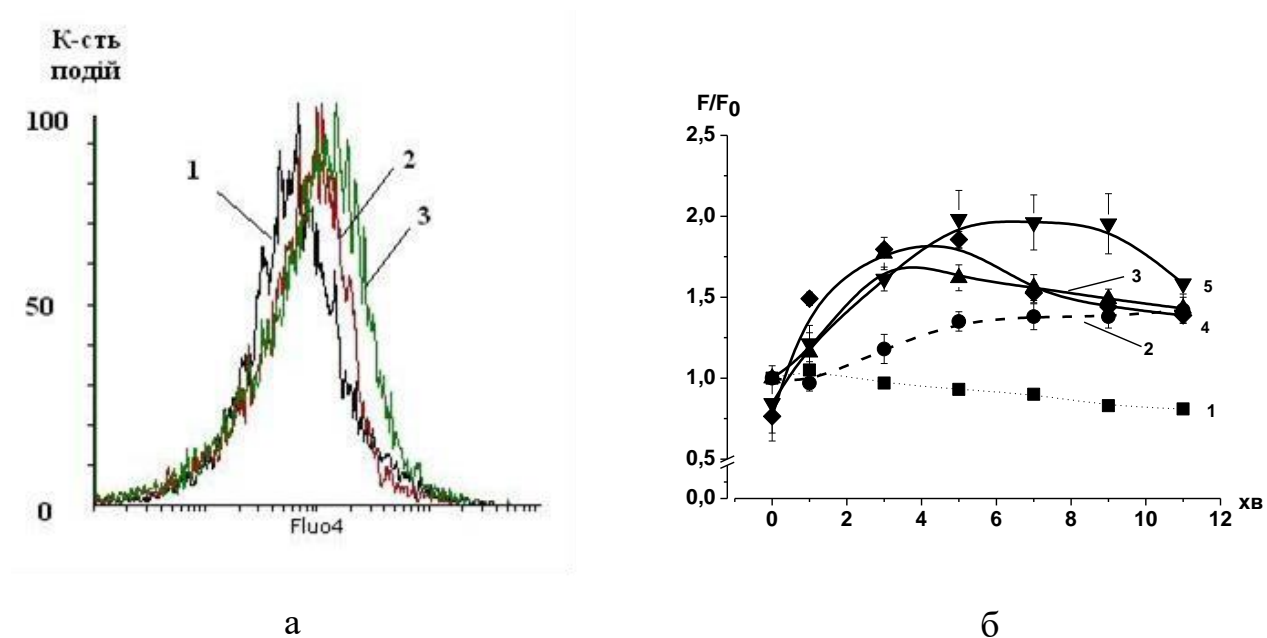


Рис. 3.14. Вплив донора сірководню NaHS на акумуляцію кальцію у мітохондріях серця старих щурів: а – нативні криві інтенсивності флуоресценції Fluo-4 AM; б – криві накопичення Ca^{2+} в часі: 1 – середовище інкубації містить слідові концентрації Ca^{2+} ; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) на мітохондрії дорослих щурів; 3 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) на мітохондрії старих щурів; 4 – преінкубація з NaHS (10^{-6} моль/л) і дія Ca^{2+} ; 5 – преінкубація з NaHS (10^{-7} моль/л) і вплив Ca^{2+}

Також досліджували участь ендогенного сірководню у регуляції кальцієвого гомеостазу мітохондрій (рис. 3.15). Преінкубація суспензії

органел з інгібітором мітохондріального ферменту синтезу сірководню О-СМН (10^{-3} моль/л) вірогідно знижувала акумулювальну і, ймовірно, кальцієву ємність мітохондрій, яка проявлялася у зниженні вмісту кальцію в мітохондріях до кінця експерименту (див. рис. 3.15., крива 2).

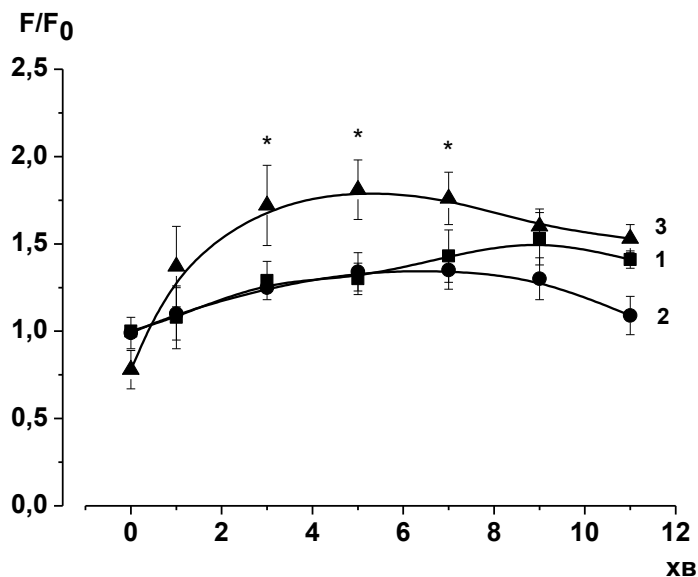


Рис. 3.15. Вплив NaHS на накопичення Ca^{2+} ізольованими мітохондріями серця щурів: 1 – дія Ca^{2+} ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 2 – преінкубація з о-карбоксиметилгідроксиламіном (О-СМН, 10^{-3} моль/л) і дія Ca^{2+} ; 3 – преінкубація з NaHS (10^{-6} моль/л) і дія Ca^{2+} . * $P \leq 0,05$ відносно значень накопичення Ca^{2+} у концентрації $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Отже, екзогенний сірководень стимулює акумуляцію кальцію в мітохондріях серця дорослих та старих щурів лише в низьких досліджуваних концентраціях, а підвищення концентрації H_2S вище фізіологічних пригнічувало накопичення катіона. Інгібування ендogenous синтезу H_2S не сприяло акумуляції кальцію мітохондріями, що вказує на регулювання Ca^{2+} -транспортуючих систем органел за фізіологічних умов.

3.4. РЕГУЛЯЦІЯ СІРКОВОДНЕМ ВІДКРИВАННЯ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ПОРИ ПЕРЕМІННОЇ ПРОНИКНОСТІ

3.4.1. Функціональні характеристики МП

Вперше зафіксовано і доведено, що явище підвищення проникнення мітохондріальних мембран ініційоване відкриванням іонного каналу у 1987 році за допомогою методу петч-клемп [158]. Пізніше було показано, що відкривання каналу інгібується мікромольними концентраціями циклоспорину А [159]. Основним методом дослідження відкривання МП на сьогодні залишається вивчення набухання мітохондрій, оскільки цей процес прямо корелює зі зниженням їхньої оптичної щільності та, відповідно, відкриванням МП. Набухання органел виникає внаслідок потрапляння макромолекул та води через відкриті пори та індукується кальцієм. У наших дослідженнях для активації МП використовували Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л. На рис. 3.16 представлено класичні характеристики набухання мітохондрій, зокрема різницю в оптичній густині суспензії органел на першій та п'ятнадцятій хвилинах без додавання кальцію в середовище (стовпчик 1) та після внесення катіона на 5-й хвилині (стовпчик 2). При цьому використання циклоспорину А (10^{-5} моль/л) повністю попереджало індуковане кальцієм набухання мітохондрій, що підтверджує залучення у цей процес МП (стовпчик 3).

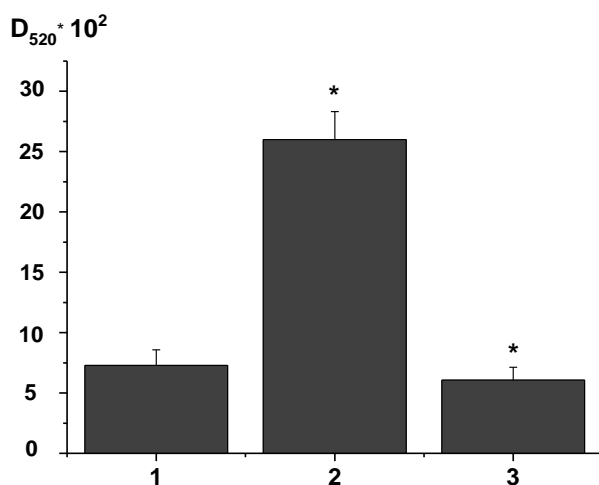


Рис. 3.16. Набухання мітохондрій серця дорослих щурів без додавання Ca^{2+} у середовище (1), за індукції МП кальцієм у концентрації 10^{-4} моль/л (2) та за умов преінкубації з циклоспорином А (10^{-5} моль/л) та Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л (3).

Також відомо, що основним транспортером Ca^{2+} в мітохондрії є МКУ. Перевірили наявність набухання мітохондрій на тлі дії інгібітора МКУ рутенію червоного. На рис. 3.17 зображено зниження оптичної густини суспензії мітохондрій без дії індуктора Ca^{2+} (крива 1), із застосуванням останнього (крива 2) та при використанні RuRed (крива 3), що свідчить про майже повну відсутність входу Ca^{2+} у органели при блокуванні МКУ.

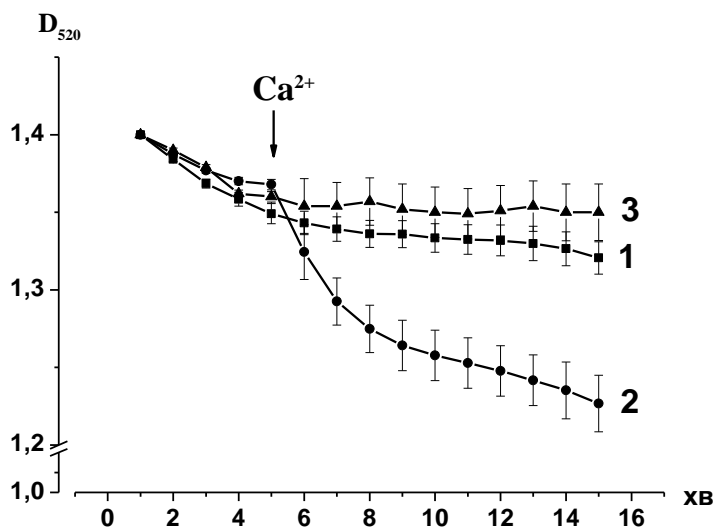


Рис. 3.17. Динаміка набухання мітохондрій серця щурів у середовищі без кальцію (1), за дії Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л (2) та при додаванні рутенію червоного (10^{-5} моль/л) і Ca^{2+} (10^{-4} моль/л, 3).

3.4.2. Вплив інгібування мітохондріального ферменту синтезу сірководню 3-MST *in vitro* на чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у серці щурів

У попередніх дослідженнях було показано, що екзогенний сірководень у концентраціях 10^{-6} - $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л попереджав кальційіндуковане відкриття МП, що свідчить про його протекторний вплив на пороутворення в серці дорослих і старих щурів [4]. Проте відомо, що існує фермент синтезу сірководню в мітохондріях, а також цей газотрансмітер може вільно проникати через мембрани органел, тому необхідно було встановити роль ендogenous сірководню на регуляцію кальцієвого гомеостазу в мітохондріях серця.

Регуляція кальцієвого обміну в мітохондріях серця ендogenous сірководнем підтверджується в експериментах *in vitro* з вивчення відкриття

МП з використанням інгібітора О-СМН. Показано, що преінкубація з ним ізольованих мітохондрій підвищує амплітуду кальційіндукованого набухання органел на 20 % (рис. 3.18., крива 3) порівняно з дією кальцію (10^{-4} моль/л; рис. 3.18., крива 2). У цій серії експериментів також було використано NaHS (10^{-5} моль/л) *in vitro*, який попереджав набухання мітохондрій серця дорослих щурів на 51 %, на тлі дії кальцію (крива 4). Попередня інкубація органел з О-СМН перешкоджала протекторному впливу сірководню на 20 % (див. рис. 3.18, крива 5).

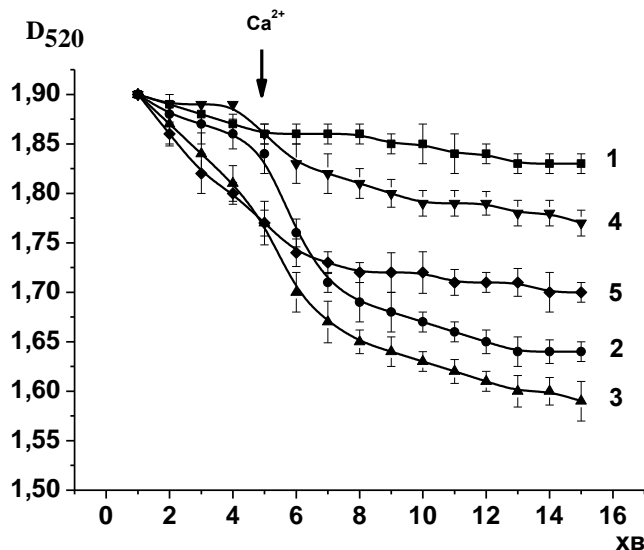


Рис. 3.18. Дія NaHS та інгібітора синтезу H_2S О-СМН на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця щурів: 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – вплив о-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН *in vitro*, 10^{-3} моль/л) і дія Ca^{2+} ; 4 – преінкубація з NaHS (10^{-5} моль/л) і дія Ca^{2+} ; 5 – преінкубація з NaHS, дія Ca^{2+} і О-СМН

Виявлено концентраційну залежність впливу О-СМН (10^{-5} – 10^{-3} моль/л) на набухання нативних мітохондрій у безкальцієвому середовищі (рис. 3.19).

Таке помірне набухання мітохондрій за умов дії інгібітора і без впливу індуктора МП Ca^{2+} попереджалось селективним інгібітором МП циклоспорином А (10^{-5} моль/л), що підтверджує залучення МП до процесу набухання мітохондрій і регуляцію її відкриття сірководнем, який синтезується в мітохондріях.

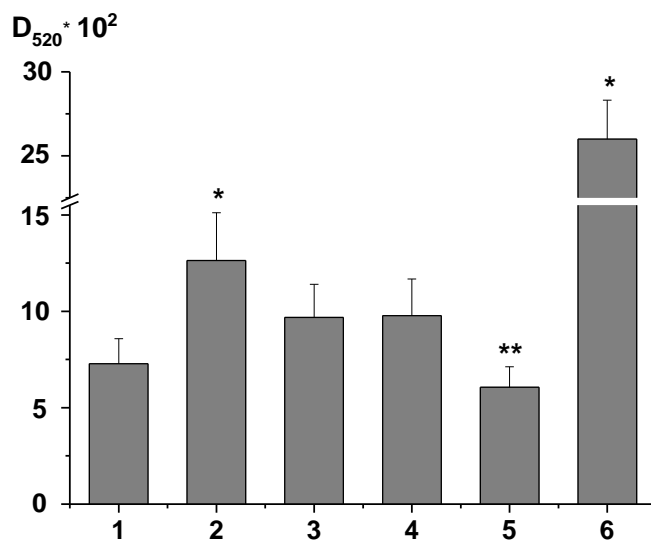


Рис. 3.19. Вплив інгібітора ферменту синтезу H_2S о-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН) на набухання мітохондрій серця щурів у безкальцієвому середовищі: 1 – контроль, 2, 3, 4 – дія О-СМН (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} моль/л відповідно), 5 – преінкубація з циклоспорином (10^{-5} моль/л) і дія О-СМН (10^{-3} моль/л), 6 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л). * $P \leq 0,05$ відносно значень у контролі, ** $P \leq 0,05$ відносно значень за впливу О-СМН 10^{-3} моль/л

Отже, за умов інгібування ендogenous синтезу H_2S в мітохондріях зростала ймовірність відкриття Цс А-чутливої МП, в результаті дії внутрішньомітохондріального кальцію чи, можливо, посиленого утворення АФК чи АФА в мітохондріях, як було показано вище.

3.4.3. Вплив пригнічення *in vivo* мітохондріального ферменту синтезу сірководню на чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у серці щурів

Раніше ми показали, що пригнічення синтезу сірководню в клітинах серця щура *in vivo* призводить до зниження здатності серця витримувати кальцієві навантаження. Тому ми припустили, що одним з механізмів послаблення стійкості серця до кальцієвих навантажень при інгібуванні мітохондріального шляху синтезу H_2S є саме відкривання МП. На рис. 3.20 показано вплив О-СМН *in vivo* (50 мг/кг) на чутливість МП до Ca^{2+} . Встановлено, що дефіцит H_2S мітохондріального походження спричиняє зниження порога чутливості до кальцію та значного підвищення амплітуди набухання мітохондрій за його дії у концентрації 10^{-4} моль/л.

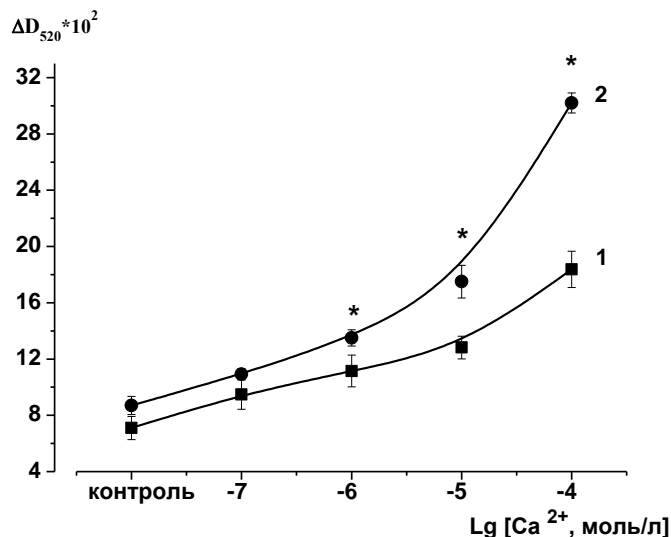
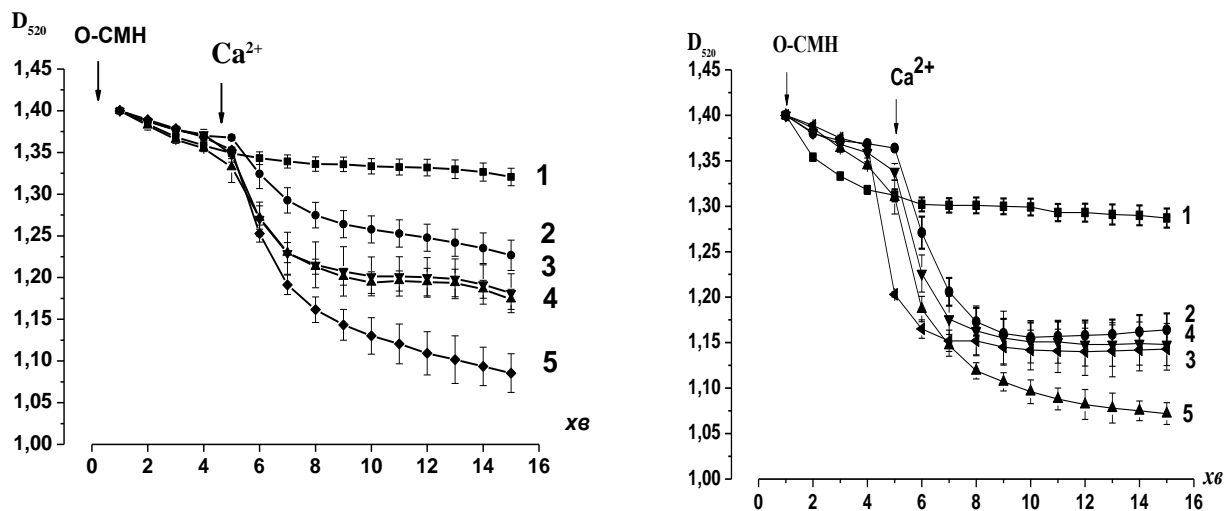


Рис. 3.20. Вплив О-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН) на динаміку набухання мітохондрій: а – зміни чутливості мітохондріальної пори (МП) серця до різних концентрацій іонів кальцію у середовищі: 1 – контроль, 2 – дія *in vivo* О-СМН (50 мг/кг); *, $P \leq 0,05$ відносно контролю

В експериментах *in vitro* ми спостерігали дозозалежний ефект дії О-СМН на Ca^{2+} -індуковане набухання мітохондрій серця дорослих та старих щурів (рис.3.21). Було показано, що О-СМН у межах концентрацій 10^{-5} – 10^{-3} моль/л посилював амплітуду Ca^{2+} -індукованого набухання мітохондрій серця дорослих щурів. При його дії у концентраціях 10^{-5} та 10^{-4} моль/л спостерігали Ca^{2+} -індуковане набухання мітохондрій, максимальний рівень якого збільшився у 1,35 рази, а за дії інгібітора ферменту 3-MPST у концентрації 10^{-3} моль/л рівень набухання збільшився у 1,9 рази.

Ми спостерігали подібний вплив інгібітора ферменту 3-MPST у старих щурів (рис. 3.21, б), але найбільш виражену дію О-СМН проявляв у концентрації 10^{-3} моль/л, коли рівень набухання збільшився у 1,38 рази.



а

Рис. 3.21. Вплив О-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН) на динаміку набухання мітохондрій у дорослих (а) та старих (б) щурів: 1 – безкальцієве середовище, 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л), 3-5 – преінкубація з О-СМН (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} моль/л відповідно) і дія Ca^{2+} . * $P < 0,05$ відносно контролю.

Таким чином, пригнічення ферменту мітохондріального синтезу сірководню збільшує чутливість мітохондрій серця до дії Ca^{2+} , що призводить

до їх набухання, а також до погіршення здатності міокарда регулювати кальцієвий метаболізм за умов перевантаження катіоном. Це може бути однією із фізіологічних ролей сірководню, що синтезується в мітохондріях ферментом 3-MPST.

3.5. NO-ЗАЛЕЖНА РЕГУЛЯЦІЯ ВІДКРИВАННЯ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ПОРИ СІРКОВОДНЕМ

Як зазначалося вище, окрім H_2S до родини газотрансмітерів належить CO та NO, які відіграють важливу біологічну роль у регуляції фізіологічних функцій організму. Відомо, що всі ці газові молекули є компонентами регуляції тонуусу кровоносних судин, зокрема скоротливих властивостей клітин гладеньких м'язів. Газотрансмітери можуть взаємно впливати один на одного як на рівні спільних мішеней дії, так і ферментів синтезу. Відомо, що сірководень як і NO відповідає за вазорелаксацію, впливаючи на K_{ATP} канали, підвищуючи рівень цГМФ в клітинах гладеньких м'язів судин [160]. Показано, що донори сірководню DADS і DATS підвищують активність eNOS через фосфорилювання Ser1177 і PKB, та як наслідок підвищують продукцію NO [161]. Також на культурі клітин HUVECs-926 встановлено, що фосфорилювання eNOS та відповідно синтез NO підвищувалися за дії NaHS [119]. З іншого боку, у мишей, нокаутуваних по гену CSE спостерігались порушення функції eNOS та зниження концентрації NO. Проте деякі дослідники виявили взаємно негативний вплив цих газотрансмітерів. Так, показано, що H_2S інгібує транскрипцію та активність eNOS [124]. Також показано, що субстрати NOS чи донори NO можуть посилювати експресію ферментів синтезу сірководню. Наприклад, нітропрурид натрію посилював активність CBS в суспензії клітин головного мозку щурів [162], L-аргінін знижував тиск в легеневій артерії, посилюючи експресію мРНК CSE [163]. В

попередніх дослідженнях показано, що вазорелаксуюча дія екзогенного сірководню є ендотелійзалежною, регулюється факторами, які знаходяться в ендотелії судин, до яких належить і NO.

Отже, гомеостаз H_2S і NO відіграє важливу роль в підтриманні судинного тону. Тому ми припустили, що інгібувальна дія екзогенного сірководню щодо кальційіндукованого відкриття МП також може бути NO-залежною. На рис. 3.22 представлені криві кальційіндукованого набухання мітохондрій. При цьому показано, що застосування інгібітора NOS L-NAME *in vivo* підвищує на 33 % амплітуду зміни оптичної густини суспензії мітохондрій за дії 10^{-4} моль/л Ca^{2+} . Тобто, за умов блокування синтезу NO МП стає більш чутливою до дії Ca^{2+} (рис. 3.22, крива 2 і крива 4). Вплив сірководню на тлі дії інгібітора NOS також знижувався на 20 %, що свідчить про взаємну регуляторну роль H_2S та NO, проте доводить важливість самостійного впливу сірководню у регуляції кальцієвого гомеостазу мітохондрій у серці щурів.

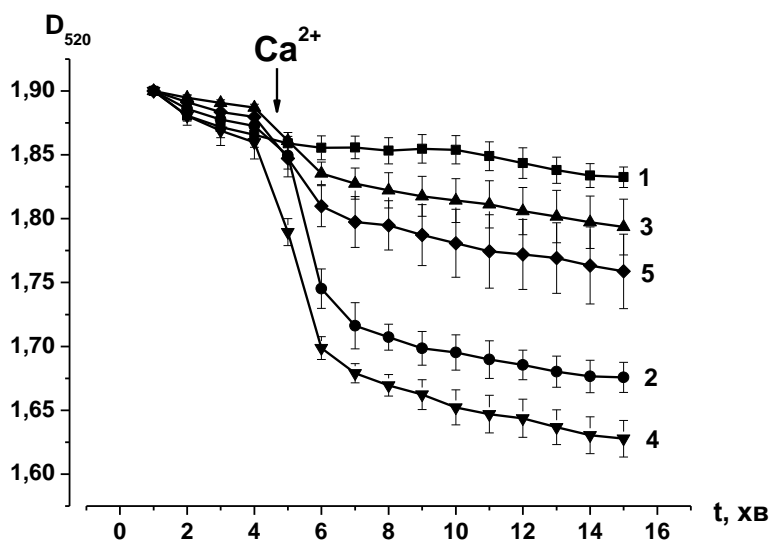


Рис. 3.22. Ca^{2+} -індуковане набухання мітохондрій серця дорослих щурів за умов блокади NOS (L-NAME, 10^{-4} моль/л): 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} 10^{-4} моль/л; 3 – дія NaHS 10^{-5} моль/л та дія Ca^{2+} ; 4 – L-NAME (10^{-4} моль/л) *in vivo* на тлі дії Ca^{2+} ; 5 – дія NaHS 10^{-5} моль/л та L-NAME *in vivo*.

3.6. РЕГУЛЯЦІЯ СІРКОВОДНЕМ ФУНКЦІЙ МІТОХОНДРІЙ ДОРΟΣЛИХ ТА СТАРИХ ЩУРІВ

3.6.1. Дослідження функціонального стану мітохондрій серця старих щурів

Хоча найбільш активно вивченням біоенергетичних параметрів займалися протягом 60-70-х років ХХ століття, дещо суперечливими залишаються результати досліджень функціонального стану дихального ланцюга старих тварин. Було показано, що у тварин при старінні ці показники не зазнають істотних змін за винятком деяких у процесі окиснення жирних кислот [154]. Саме так можна пояснити адаптацію організму до процесу старіння на функціональному рівні. Інші ж дослідники підтверджують зниження ефективності роботи дихального ланцюга у щурів з віком у результаті зміни активності ферментів циклу Кребса [157]. Їхня робота при старінні змінюється в різних тканинах неоднаково, а часом і різноспрямовано. Такі відмінності в результатах можуть виникати внаслідок функціонального та топологічного диференціювання мітохондрій кардіоміоцитів, які, як відомо, поділяються на дві популяції: субсарколемальних та інтерфібрилярних мітохондрій. Вважається, що функціональні характеристики дихального ланцюга перших не змінюються у старих тварин, тоді як у других спостерігається помітне зниження значень ДК та АДФ/О [164].

Також вважається, що відмінності у результатах дослідження мітохондріального дихання у щурів різного віку можуть залежати від субстрату, який використовували в експериментах. При окисненні сукцинату споживання кисню в серці старих тварин не відрізняється від такого у дорослих. Тому нами було використано два субстрати для активації першого та другого комплексів ЕТЛ незалежно один від одного. При вивченні показників мітохондріального дихання з використанням сукцинату як субстрату для комплексу II дихального ланцюга, показано, що швидкість споживання кисню у мітохондріях серця старих тварин у стані V_2 за Чансом підвищувалася у 1,16 раза порівняно з дорослими. Проте швидкість АДФ-стимульованого дихання в органелах цих тварин мала тенденцію до зниження (рис. 3.23, а), а це, у свою чергу, призводило до достовірного зменшення показників дихального контролю за Чансом (V_3/V_4) у 1,18 раза та за Ларді (V_3/V_2) у 1,6 раза (рис. 3.24, а).

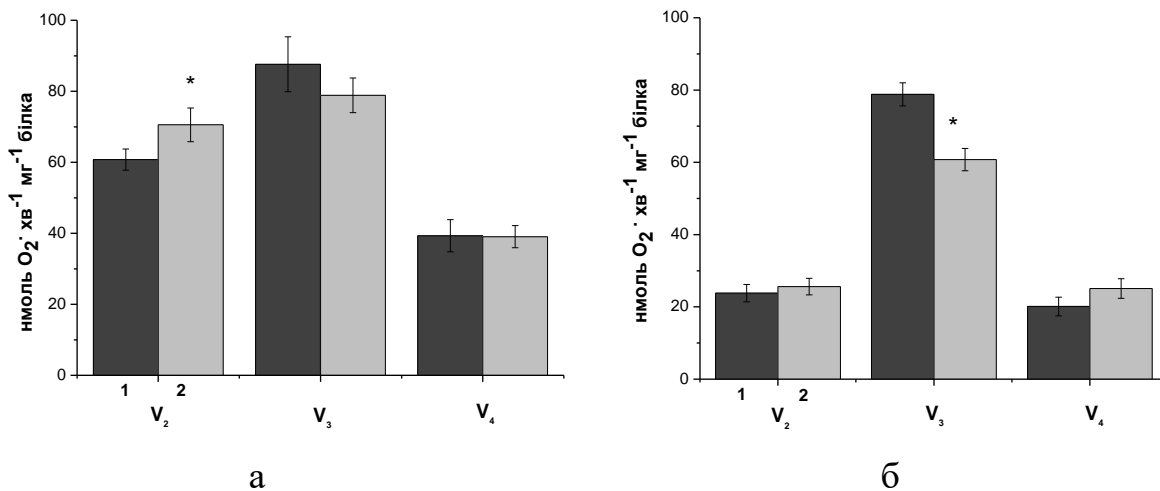


Рис. 3.23. Швидкість споживання кисню мітохондріями серця дорослих (1) і старих (2) щурів у станах V_2 , V_3 та V_4 за Чансом, з використанням

субстрату сукцинату (а) та глутамату (б). * $P \leq 0,05$ відносно значень у дорослих щурів

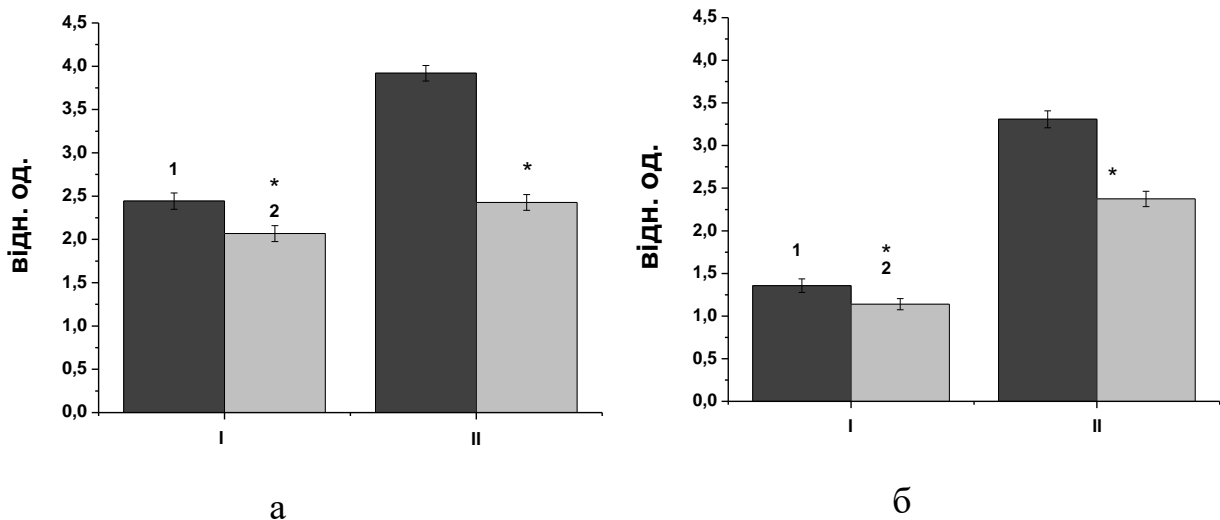


Рис. 3.24. Дихальний контроль за Чансом, V3/V4 (а) та Ларді, V3/V2 (б) за наявності сукцинату (I) і глутамату (II) у мітохондріях серця дорослих (1) і старих (2) щурів. * $P \leq 0,05$ відносно значень у дорослих щурів

Дещо інші результати отримали, використовуючи НАД-залежний субстрат для стимуляції активності комплексу I дихального ланцюга – глутамат. Хоча показник V_2 був тотожним як у дорослих, так і старих щурів, достовірне зниження V_3 на 24 % з віком (див. рис. 3.23, б) призводило до помірного зменшення показника ДК як за Чансом (у 1,18 раза), так і за Ларді (у 1,4 раза; див. рис. 3.24, б). Зниження значень цих величин свідчить про порушення процесу спряження окиснення та фосфорилування, що пов'язано зі змінами транспорту електронів і протонів у дихальному ланцюзі. Це може бути зумовлено зниженням активності ферментів, що його формують, чи процесу переносу електронів від субстратів окиснення внаслідок структурних змін у дихальному ланцюзі при старінні.

Результати цього дослідження вказують на те, що швидкість АДФ-стимульованого дихання незначно, проте все-таки змінюється з віком, ймовірно, внаслідок підвищення рівня окисного стресу. І цю різницю легше виявити, використовуючи субстрати для роботи I комплексу ЕТЛ. Оскільки, як свідчать дані літератури, вміст сукцинату при старінні зростає внаслідок помірних гіпоксичних умов, які встановлюються з віком [165]. Тому відбувається регуляторне репрограмування роботи дихального ланцюга: оборотне пригнічення електронно-транспортної функції комплексу I і компенсаторна активація комплексу II. Вміст сукцинату в крові і тканинах різко зростає. При цьому внесок сукцинатоксидазного окиснення в загальне дихання може сягати 70-80 % порівняно з 20-30 % при нормоксичному стані. Вважається, що перемикання окиснення НАД-залежних субстратів у дихальному ланцюзі на окиснення сукцинату є обов'язковим еволюційно сформованим сигнальним компенсаторним механізмом, завдяки чому забезпечується збереження енергосинтезувальної функції ЕТЛ при порушенні кисневого гомеостазу [166].

Основним показником ефективності фосфорилування АТФ є відношення між синтезом АТФ та поглинанням кисню (АДФ/О). Наші дослідження показали, що незважаючи на часткове зниження ДК за Чансом та Ларді, ефективність фосфорилування не змінюється. Також не було зафіксовано достовірного зменшення швидкості фосфорилування АТФ, що, ймовірно, є результатом адаптації до старіння (рис. 3.25).

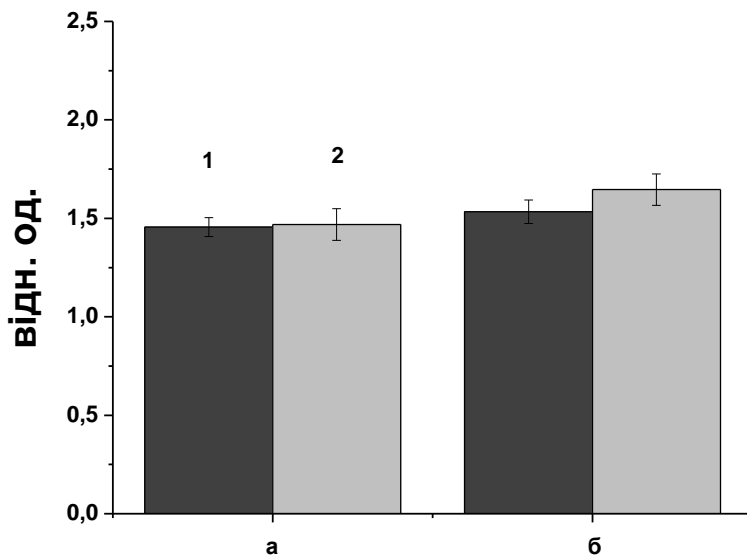


Рис. 3.25 Значення показника АДФ/О у суспензії ізольованих мітохондрій дорослих (1) та старих (2) щурів з використанням субстрату сукцинату (а) та глутамату (б)

Отже, у тварин при старінні незначно знижувалися киснезалежні процеси, про що свідчать показники дихання мітохондрій в усіх метаболічних станах, та активність споживання кисню за умов окиснення глутамату і сукцинату, при цьому синтез АТФ відбувався досить ефективно, що вказує на збереження АТФ-синтазної активності мітохондрій. Окрім дослідження відмінностей окисного фосфорилування у тварин різних вікових груп вивчали також дію Ca^{2+} у різних концентраціях на функції органел за умов активації сукцинатзалежного шляху окиснення у мітохондріях серця. Як видно з таблиці, додавання катіона у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} і 10^{-4} моль/л у суспензію мітохондрій дорослих щурів достовірно підвищувало швидкість дихання у субстратному стані V_2 за Чансом. Ймовірно, активність кальційзалежних ферментів підвищувалася, що стимулювало прискорене перенесення електронів по дихальному ланцюгу. З іншого боку, швидкість АДФ-

стимульованого дихання навпаки знижувалася при дії Ca^{2+} у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} та 10^{-4} моль/л на 13, 19 та 25 % відповідно. Проте за дії найнижчої з використаних концентрацій (10^{-7} моль/л), у мітохондріях серця дорослих тварин ДК за Ларді не змінювався, а показники ДК за Чансом та АДФ/О достовірно зростали, що свідчить про підвищення спряження процесів окиснення і фосфорилування. Швидкість фосфорилування АДФ також залишалася незмінною. Екзогенний кальцій у високих концентраціях 10^{-5} та 10^{-4} моль/л призводив до часткового зниження активності роботи дихального ланцюга у дорослих тварин, можливо, внаслідок зменшення мітохондріального потенціалу, яке відбувається під час формування МП.

Оскільки мітохондрії серця старих тварин виявилися більш чутливими до накопичення позаклітинного кальцію, а також характеризуються підвищеною чутливістю МП до Ca^{2+} , тому поглинання кисню за дії цього катіона в концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} та 10^{-4} моль/л у двох метаболічних станах V_3 і V_4 знижувалося. У органелах кальцій у невисоких концентраціях (10^{-7} моль/л) достовірно не підвищував ДК за Чансом, коефіцієнт АДФ/О та швидкість фосфорилування. З таблиці видно, що він у всіх концентраціях вірогідно знижує АДФ-стимульоване дихання, а коефіцієнт ДК за Чансом лише при дії 10^{-5} і 10^{-4} моль/л. Показники АДФ/О та АДФ/ Δt також мали тенденцію до зниження. Найбільш ефективно катіони кальцію стимулювали дихання у концентрації 10^{-7} моль/л, яка характерна для саркоплазми кардіоміоцитів за діастолі. Мабуть це пов'язано з імпульсним надходженням крові і поживних речовин до серця саме під час його розслаблення і готує до наступного акту скорочення.

Отже, при старінні інтенсивність роботи дихального ланцюга мітохондрій за наявності АДФ, згідно з нашими результатами, зменшувалася. Можливою причиною зниженої здатності окиснювати субстрати

мітохондріями є зміна активності ферментів, що формують цей ланцюг і, за участю яких здійснюється перенесення електронів. Відомо, що у старих тварин зменшується кількість самих органел у кардіоміоцитах. Усе це супроводжується зниженням концентрації АТФ у клітинах і як наслідок порушенням енергопостачання серця і функціонування органа загалом. Ми також показали, що активність роботи ЕТЛ є кальційзалежною, катіон у низьких концентраціях інтенсифікував процеси дихання у дорослих тварин, тоді як навантаження ним – пригнічувало, що може вказувати на негативний вплив високих концентрацій катіона на цей процес. При цьому у мітохондріях серця старих тварин при дії екзогенного кальцію у невисоких концентраціях (10^{-7} моль/л) спостерігали тенденцію до активації процесів спряження окиснення і фосфорилування, про що свідчить незначне зростання ДК за Чансом на тлі збереження ефективності фосфорилування. Проте дія Ca^{2+} у вищих концентраціях, а саме 10^{-4} моль/л, характеризує вже патологічні умови, за яких досліджувані параметри дихання знижувалися. Це говорить про пригнічення з віком процесу дихання і ймовірної дисфункції органел.

Таблиця 1. Зміни швидкості АДФ-стимульованого дихання ізольованих мітохондрій серця дорослих та старих щурів при дії різних концентрацій кальцію (10^{-7} моль/л – 10^{-4} моль/л) з використанням субстрату окиснення сукцинату (5 ммоль/л)

Параметри	Дорослі				Старі			
	Контроль	Дія кальцію, моль/л			Контроль	Дія кальцію, моль/л		
		10^{-7}	10^{-5}	10^{-4}		10^{-7}	10^{-5}	10^{-4}
Швидкість споживання кисню без АДФ при дії Ca^{2+} , нмоль/хв/мг білка (V2)	60,77±2,9 7	70,15±5,19 *	70,2±2,3*	67,4±2,29*	70,5±4,75 *	75,64±7,27	69,2±4,5	68,84±5,9
Швидкість фосфорильованого дихання мітохондрій, нмоль/хв/мг білка (V3)	87,6±7,7	76,49±1,47 *	71,12±3,2 *	65,5±0,91*	78,8±4,85	66,63±3,18* *	64,8±2,8* *	51,5±1,97**
Швидкість контрольованого дихання мітохондрій,	39,3±4,5	28,32±1,2*	30,92±2,5 *	34,5±1,8	39,02±3,1 2	31,73±5,4**	38,12±2,4	32,18±3,4

нмоль/хв/мг білка (V4)								
Коефіцієнт дихального контролю за Чансом	2,44±0,09	2,7±0,02*	2,3±0,03	1,9±0,05*	2,06±0,09 *	2,10±0,75	1,7±0,22* *	1,6±0,4**
Коефіцієнт дихального контролю за Ларді	1,35±0,08	1,24±0,038	1,19±0,18	1,13±0,007 *	1,14±0,06 *	0,88±0,068* *	0,93±0,01 4	0,75±0,019* *
Коефіцієнт ефективності фосфорилування, мкмоль/ нмоль O ₂ (АДФ/О)	1,45±0,05	1,63±0,06*	1,4±0,15	1,35±0,16	1,46±0,08	1,53±0,25	1,52±0,23	1,38±0,24
Швидкість фосфорилування АДФ, нмоль/хв/мг білка (АДФ/Δt)	69,80±5,0 4	65,8±7,9	65,75±14, 7	63,4±2,13	64,13±7,8 4	65,06±1,64	58,9±5,7	55,84±7,3

3.6.2 Вплив пригнічення *in vivo* мітохондріального ферменту синтезу сірководню на функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій серця щурів

Дихальний ланцюг являє собою складну мультикомпонентну структуру, яка складається з 5 комплексів, локалізованих на внутрішній мембрані мітохондрій: НАДН-СoQ-оксидоредуктаза (комплекс I), сукцинат-СoQ-оксидоредуктаза (комплекс II), СoQ-цитохром-с-оксидоредуктаза (комплекс III), цитохром-с-оксидаза (комплекс IV) і АТФ-синтаза. В результаті спряженої роботи цих ферментів відбувається перенесення електронів від НАДН і сукцинату на молекулярний кисень з утворенням води, а енергія окиснення запасється у формі АТФ. Відомо, що саме внаслідок роботи дихального ланцюга клітини серця отримують 90 % енергії, потрібної для скорочення серцевого м'яза. Вище ми зазначали, що застосування інгібітора мітохондріального ферменту синтезу сірководню *in vivo* призводило до зниження вихідних показників кардіодинаміки ізольованого серця дорослих щурів, а також зменшувало функціональні резерви міокарда за умов кальцієвих навантажень [166]. Зниження функціональних показників роботи серця може бути зумовлено порушенням роботи мітохондрій кардіоміоцитів. Тому ми використали інгібітор мітохондріального ферменту синтезу сірководню у дозі 50 мг/кг і дослідили функціональний стан органел при його застосуванні. Виявили, що при дії О-СМН *in vivo* значно погіршувалася робота дихального ланцюга, що проявлялося у зниженні швидкості дихання (рис. 3.26).

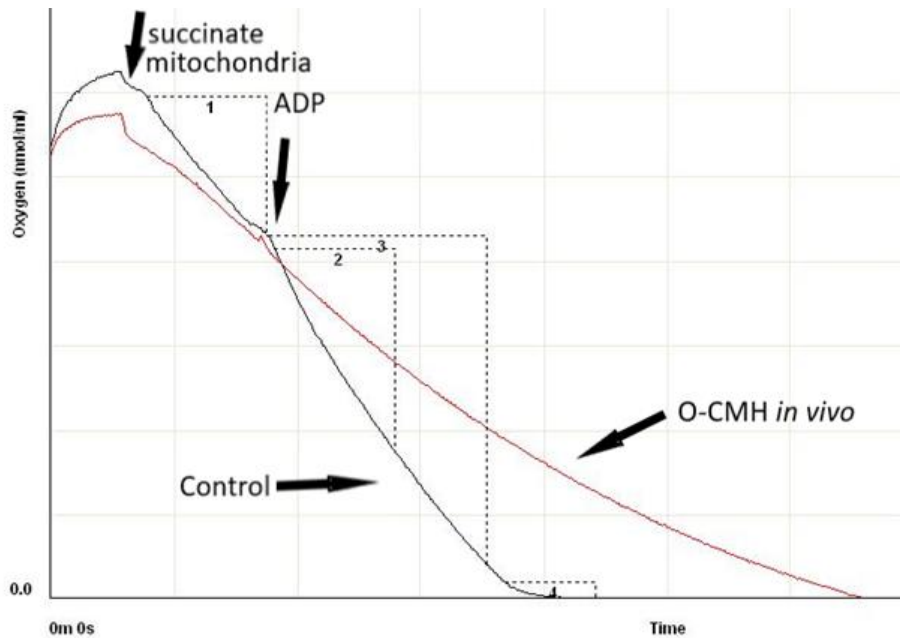


Рис. 3.26. Нативні криві споживання кисню мітохондріями серця дорослих щурів та органелами з інгібованим синтезом H_2S

При цьому зменшувалася швидкість споживання кисню у стані V_2 та достовірно знижувалася швидкість АДФ-стимульованого дихання V_3 . З рис. 3.26 видно, що за дії інгібітора не спостерігали чіткого перелому кривої у стані V_4 , коли вичерпується АДФ, що свідчить про знижену функціональну здатність мітохондрій серця дослідних тварин. Значення дихального контролю за Чансом та Ларді, які характеризують ефективність роботи дахального ланцюга мітохондрій також відповідно знижувалися у 1,32 та 1,29 раза (рис. 3.28). Також достовірно зменшувалося значення АДФ/О, що характеризує sprzęження процесів окиснення і фосфорилування у мітохондріях (див. рис. 3.29).

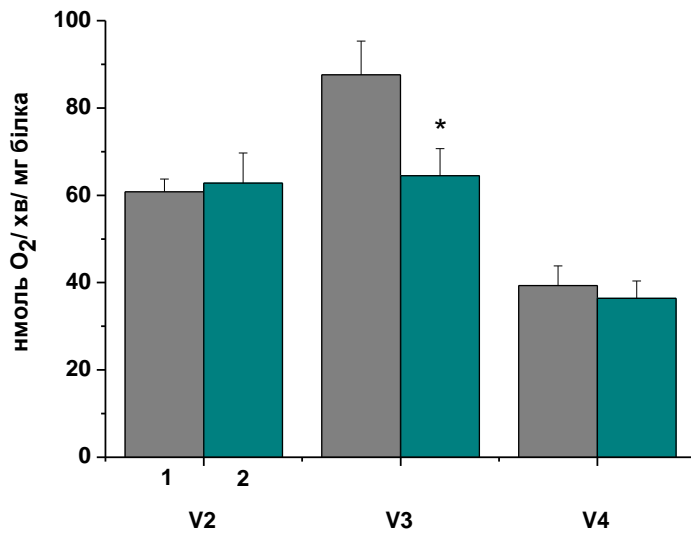


Рис. 3.27. Швидкість споживання кисню мітохондріями серця контрольних тварин (1) та щурів з введенням О-СМН *in vivo* 50 мг/кг (2) у станах V₂, V₃ та V₄ за Чансом, з використанням субстрату сукцинату. *P≤0,05 відносно значень у дорослих щурів

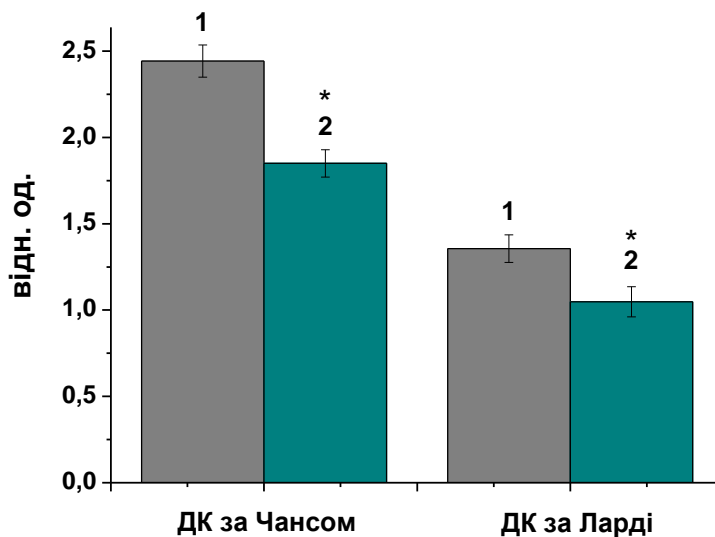


Рис. 3.28. Дихальний контроль за Чансом, V₃/V₄ та Ларді, V₃/V₂ за наявності сукцинату у середовищі інкубації у суспензії мітохондрій серця

контрольних тварин (1) та щурів з введенням О-СМН і *vivo* 50 мг/кг (2).
* $P \leq 0,05$ відносно значень у дорослих щурів

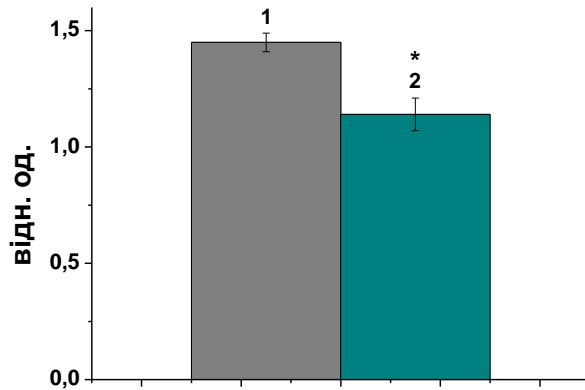


Рис. 3.29. Значення показника АДФ/О у суспензії ізольованих мітохондрій контрольних тварин (1) та щурів з введенням О-СМН і *vivo* 50 мг/кг (2) з використанням субстрату сукцинату. * $P \leq 0,05$ відносно значень у дорослих щурів

Отже, введення інгібітора мітохондріального шляху синтезу сірководню погіршувало функціональну здатність електронно-транспортного ланцюга, що проявлялася у зниженні швидкості споживання кисню у станах V_2 , V_3 та V_4 , а також показників ДК та АДФ/О. Це, ймовірно, є однією з головних причин погіршення функціональної роботи серця, зокрема зниження тиску лівого шлуночка ($P_{\text{шл}}$), dP/dt_{max} і dP/dt_{min} та коронарного потоку, що було показано нами раніше [166]. Адже, саме ефективність енергетичного забезпечення міокарда, за яку відповідають мітохондрії, є визначальною для роботи серця.

ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ

Сірководень – газовий медіатор, який ферментативно синтезується в організмі ссавців та виконує чимало фізіологічних функцій. Так відомо, що він здатен розширювати судини за рахунок активації K_{ATP} -залежних каналів плазматичної мембрани клітин гладеньких м'язів [167], попереджати запалення, індуковане прозапальними цитокінами за ішемії-реперфузії [168] та зменшувати кількість лейкоцитів і нейтрофілів в зоні ішемії під час реперфузії [84], стимулювати ангиогенез, підвищуючи експресію VEGF [169], та активуючи шлях фосфатидилінозитол 3-кіназа/Akt [86]. Відомо, що H_2S має антиапоптичну дію, пригнічуючи активацію каспази-3 та глікогенсинтази кінази-3 β , він також активує ендотеліальну NOS, що призводить до підвищення вмісту NO. Сірководень регулює експресію міРНК, має антиоксидантні властивості та діє на різні типи іонних каналів, зокрема активує K_{ATP} -канали, підвищує провідність Na^+ та інгібує Cl^- та Ca^{2+} канали L типу [3].

Відомо, що сірководень синтезується в мітохондріях за допомогою ферменту 3-MPST та катаболізується також в цих органелах. Вважається, що частково інгібуючи цитохром-с-оксидазу та пригнічуючи роботу ЕТЛ, H_2S захищає мітохондрії під час ішемічно-реперфузійного пошкодження. Оскільки мітохондрії є основними постачальниками АТФ у клітинах серця, а також беруть участь в низці інших важливих процесів, необхідно було дослідити вплив сірководню на кальцієвий гомеостаз органел. Як зазначалося вище, Ca^{2+} - це життєво необхідний катіон, який відповідає за спряження процесу скорочення-розслаблення в серці, за рахунок постійного руху в цитозоль та з нього. Цей обмін забезпечується, головним чином, транспортерами плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму. І хоча мітохондрії

не відіграють такої суттєвої ролі в депонуванні кальцію та його вивільненні під час скорочення-розслаблення, цей катіон може накопичуватися в органелах, активувати їхні функції та, у великих кількостях, запускати механізм смерті клітини шляхом апоптозу через активацію мітохондріальної пори. Тому для клітин серця дуже важливим є підтримання гомеостазу кальцію в клітинах та мітохондріях зокрема. Адже відомо, що перевантаження клітин Ca^{2+} відбувається за серцевої недостатності, ішемічно-реперфузійних пошкодженнях, а також при старінні.

Досліджували вплив екзогенного та ендогенного сірководню на вхід Ca^{2+} в мітохондрії, чутливість МП до цього катіона-індуктора, а також функцію мітохондрій та серця за умов кальцієвих навантажень, використовуючи донор H_2S NaHS та інгібітор його мітохондріального шляху синтезу О-СМН. Оскільки відомо, що при старінні вміст сірководню в клітинах серця та судин знижується, використовували старих тварин як модель природного дефіциту H_2S в організмі. Доцільність використання інгібітора синтезу сірководню О-СМН перевірили, визначивши вміст H_2S в мітохондріях та плазмі крові дослідних тварин. Виявили, що внутрішньоочеревинне застосування О-СМН (50 мг/кг) призводило до зниження вмісту цього газотрансмітера в мітохондріях та плазмі крові дослідних тварин на 25 та 45 % відповідно.

За умов попереднього пригнічення мітохондріального синтезу сірководню виявили, що вихідні показники кардіодинаміки суттєво погіршувалися у дослідних тварин. Так, удвічі знижувалися $P_{\text{шл}}$, dP/dt , а коронарний потік зменшувався на 11,8 %. Незважаючи на те, що ЧСС мала тенденцію до зростання, робота серця (ІСФ) у тварин після введення блокатора 3-MPST залишалася вдвічі нижчою, ніж в інтактних щурів. Отже, нами було показано, що ендогенний сірководень, який синтезується в мітохондріях

необхідний для підтримання роботи серця за фізіологічних умов. Навантажуючи ізольовані серця Ca^{2+} шляхом підвищення концентрації катіона в перфузійному розчині з 1,7 мМ до 12,5 мМ показали, що серця дослідних тварин розвивали менш потужну реакцію, яка проявлялась у знижених значеннях $P_{\text{шл}}$, скорочувальної активності, КП та ІСФ міокарда. Максимальна сила скорочення серця у контрольних тварин спостерігалася у відповідь на додавання 7,5 ммоль/л CaCl_2 , тоді як у дослідних – 5 ммоль/л CaCl_2 , що характеризує зниження функціональних резервів міокарда у тварин за умов пригнічення мітохондріального синтезу сірководню.

Як відомо, сірководень є потужним антиоксидантом. Такі ефекти він реалізує через кілька механізмів. Зокрема показано, що H_2S підвищує активність Mn-SOD і CuZn-SOD та знижує рівень АФК в кардіоміоцитах під час ішемії-реперфузії. [2] H_2S знижує перекисне окиснення ліпідів через захоплення гідрогенпероксиду і супероксидного радикалу в моделі ізопротеренол-індукованого пошкодження міокарда [170]. Сірководень здатен активувати транскрипційний фактор Nrf2, який підвищує експресію певних генів і специфічних факторів, таких як HO-1, глутатіон редуктази, глутатіон-S-трансферази, тіоредоксину і каталази, які відіграють роль в ендогенному антиоксидантному захисті. Більше того, сірководень має інгібіторний ефект на фосфодіестеразу-5 (PDE-5), що призводить до зниження утворення NADPH оксидази, а активність антиоксидантних ферментів зростає [171]. Окрім цього відомо, що сірководень є прямим скавенджером АФК, таких як пероксинітрит [79] і прямо руйнує органічні гідроперокси, такі як гідроперокси жирних кислот [80]. Отже, літературні дані підтверджують, що сірководень попереджає утворення АФК, також захоплює АФК та підсилює антиоксидантну систему захисту. Тому в наших експериментах застосування інгібітора синтезу H_2S призводило до підвищення швидкості генерації $\cdot\text{O}_2^-$ та

ОН-радикалів як в мітохондріях, так і в плазмі крові, що свідчить про інтенсифікацію процесів утворення вільних радикалів. Підвищувалися також вміст продуктів ПОЛ – ДК та МДА у плазмі крові, що вказує на інтенсифікацію процесу окиснення ліпідів АФК в судинному руслі.

Досліджували роль сірководню у регуляції входу кальцію в мітохондрії та відкриття МП, адже відомо, що H_2S синтезується в цих органелах та утилізується до сульфатів. Отже, ймовірно, він відіграє певну роль у підтриманні функціонування мітохондрій та кальцієвому гомеостазі. Відомо, що сірководень у низьких, не токсичних концентраціях сприяє біогенезу та функціонуванню мітохондрій, тим самим попереджуючи загибель клітин [172]. Він безпосередньо впливає на активність електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ), діючи як субстрат чи антагоніст цитохром-*c*-оксидази. Так, у концентраціях менше ніж 20 мкмоль/л H_2S може виступати єдиним неорганічним субстратом, слугуючи донором електрона для ЕТЛ за допомогою фермента сульфідхіноноксидоредуктази (SQR). Електрони, вивільнені при окисненні H_2S , захоплюються убихіноном і передаються по дихальному ланцюгу до комплексу III для подальшого поширення. Ця активність, ймовірно, стимулює фосфорилування та продукцію АТФ у клітинах. Однак з підвищенням вмісту H_2S інгібіторний вплив на ЕТЛ може пересилувати його стимулюючу дію до цілковитого пригнічення функціонування мітохондрій. Концентрації, які потрібні для повного інгібування цитохром-*c*-оксидази в різних моделях залежать від таких факторів, як тип клітини та клітинне середовище. За цих умов H_2S є високоцитотоксичним, оскільки пригнічує активність ЕТЛ, знижує вміст внутрішньоклітинного АТФ, посилює генерацію АФК, індукує мітохондріальну деполяризацію та апоптоз. Крім того, у високих концентраціях він додатково інгібує вироблення АТФ за допомогою регуляції

роз'єднувального білка 2 (UCP 2), який розсіює градієнт протонів і призводить до порушення синтезу АТФ. Припускають, що завдяки цим процесам клітини можуть адаптуватися до високих концентрацій H_2S [172, 173].

Виявили, що екзогенний сірководень ($10^{-6} - 10^{-7}$ моль/л) підвищує вхід Ca^{2+} в мітохондрії серця дорослих та старих щурів в умовах кальцієвого навантаження, адже флуоресцентний сигнал кальційчутливого барвника посилювався. При цьому підтвердили, що мітохондрії з тканини серця старих тварин акумулюють кальцій активніше та швидше у часі, ймовірно, за рахунок активації МКУ підвищеним вмістом АФК. Це узгоджується з нашими попередніми результатами щодо підвищеної чутливості МП до кальцію у старих щурів [12]. В той же час в попередніх дослідженнях показано, що екзогенний H_2S в тотожних концентраціях попереджає відкривання МП [4]. Тому ми припускаємо, що підвищення флуоресценції кальційчутливого барвника за дії сірководню може бути не в результаті посилення входу Ca^{2+} , а в наслідок закривання МП та накопичення кальцію в органелах. Механізми та наслідки цих процесів мають бути досліджені більш детально. Застосування інгібітора синтезу H_2S *in vivo* знижувало вхід кальцію в органели.

Отже, екзогенний сірководень попереджав відкривання МП. Використавши інгібітор ендogenous мітохондріального синтезу H_2S O-СМН *in vitro* показали, що відсутність газотрансмітера підвищує амплітуду кальційіндукованого набухання органел на 20 % за умов навантаження мітохондрій кальцієм. У цій серії експериментів також було використано NaHS (10^{-5} моль/л) *in vitro*, який попереджав набухання мітохондрій серця дорослих щурів на 51 %, на тлі дії кальцію, а попередня інкубація органел з O-СМН перешкоджала протекторному впливу сірководню. Застосувавши цей інгібітор *in vivo* встановили, що дефіцит H_2S мітохондріального походження

спричиняє зниження порога чутливості до кальцію та значного підвищення амплітуди набухання мітохондрій за його дії у концентрації 10^{-4} моль/л.

Таким чином, показано, що як екзогенний так і ендогенний сірководень впливає на транспорт кальцію в мітохондріях серця дорослих і старих щурів і бере участь в регуляції його гомеостазу. Оскільки H_2S не єдиний газотрансмітер в організмі ссавців та людини, а лише один з трьох відомих, то безсумнівно вони взаємодіють один з одним. Показано, що сірководень є природним підсилювачем NO-сигналювання у судинах, оскільки може формуватися проміжна S/N сполука, а також H_2S здатен індукувати вивільнення NO зі стабільних пулів (наприклад нітриту) [174]. Також H_2S підвищує активність NO синтази, прямо впливаючи на фермент, шляхом сульфгідрування важливих залишків цистеїну, що також призводить до спряження ензиму, посилюючи синтез NO, а не супероксидного радикалу [174]. Також сірководень стабілізує розчинну гуанілатциклазу у відновній формі. Проте, не відомо чи взаємодіють два газотрансмітери на рівні впливу на Ca^{2+} -індуковану МП. Хоча відомо, що NO самостійно здатний попереджати відкривання цього каналу [175]. Вивчаючи попередження відкривання МП сірководнем на тлі інгібування NOS показали, що застосування інгібітора NOS L-NAME *in vivo* підвищує амплітуду зміни оптичної густини суспензії мітохондрій за дії 10^{-4} моль/л Ca^{2+} , а вплив сірководню на тлі дії інгібітора NOS знижувався на 20 %, що свідчить про взаємну регуляторну роль H_2S та NO, проте доводить важливість самостійного впливу сірководню у регуляції кальцієвого гомеостазу мітохондрій у серці щурів.

У попередніх дослідженнях ми показали вплив екзогенного сірководню на роботу дихального ланцюга мітохондрій [176]. Донор H_2S у діапазоні концентрацій 10^{-9} – 10^{-6} моль/л дозозалежно знижував швидкості поглинання кисню за наявності сукцинату Na та АДФ (стан 3 за Чансом), а також за

відсутності останнього (стан 4). Проте таке часткове пригнічення роботи ЕТЛ, ймовірно, мало захисний характер, а зменшення швидкості споживання кисню мітохондріями супроводжувалося збільшенням спряженості процесів окиснення та фосфорилування, про що свідчить збільшення дихального контролю. У дисертаційній роботі вивчали вплив пригнічення синтезу H_2S на функціональний стан ЕТЛ, а також досліджували дихання мітохондрій в умовах природного дефіциту H_2S , тобто у старих тварин. Виявили, що у тварин при старінні киснезалежні процеси незначно та знижувалися, при цьому синтез АТФ відбувався досить ефективно, що вказує на збереження АТФ-синтазної активності мітохондрій. Також показали дію екзогенного кальцію на функціональний стан ЕТЛ. Такий вплив був дозозалежним, зокрема у низьких концентраціях катіон інтенсифікував процеси дихання у дорослих тварин, тоді як навантаження ним пригнічувало роботу ЕТЛ. При цьому у мітохондріях серця старих тварин при дії екзогенного кальцію у невисоких концентраціях (10^{-7} моль/л) спостерігали тенденцію до активації процесів спряження окиснення і фосфорилування. Дія Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л, характеризує вже патологічні умови, за яких досліджувані параметри дихання знижувалися.

При вивченні впливу інгібування синтезу H_2S в мітохондріях виявили погіршення функціональної здатності ЕТЛ, що проявлялася у зниженні швидкості споживання кисню у станах V_2 , V_3 та V_4 , а також показників ДК та АДФ/О. Це, ймовірно, є однією з головних причин погіршення функціональної роботи серця, що було показано нами раніше. Адже, саме ефективність енергетичного забезпечення міокарда, за яку відповідають мітохондрії, є визначальною для роботи серця.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що сірководень регулює кальцієвий гомеостаз у мітохондріях серця щурів. Так, позамітохондріальний сірководень у концентраціях близьких до фізіологічних (10^{-6} і 10^{-7} моль/л) помірно підвищував вхід кальцію в органели у дорослих та старих щурів. При цьому спостерігали H_2S -залежне пригнічення відкриття кальційіндукованої мітохондріальної пори. З іншого боку, зниження вмісту H_2S в самих органелах при інгібуванні його ферменту синтезу або ж в умовах фізіологічного старіння призводило до інтенсифікації вільнорадикальних процесів та порушення роботи серця внаслідок зниження функціонування мітохондрій. Ці результати є доказом мітопротекторної дії газового трансмітера сірководню, який синтезується в першу чергу 3-MPST, і свідчать про регуляцію роботи серця і запобігання патогенних станів.

1. Пригнічення *in vivo* ферменту синтезу сірководню 3-MPST призводило до зменшення вмісту H_2S у мітохондріях серця та плазмі крові щурів. При цьому спостерігали порушення роботи серця, а саме зниження показників кардіодинаміки: Рлшл, dP/dt max і dP/dt min, коронарного потоку та зменшення функціональних резервів міокарда при кальцієвих навантаженнях.
2. Застосування інгібітора H_2S -синтезуючого ферменту спричиняло інтенсифікацію вільнорадикальних процесів, зокрема збільшувало вміст $\cdot O_2^-$ та $\cdot OH$ -радикалів, посилювало ПОЛ та збільшувало активність індукцйбельного синтезу NO на тлі зменшення функціональної активності cNOS як в мітохондріях серця (mtNOS), так і в плазмі крові дорослих щурів. Розвиток оксидативного стресу, який спостерігали в

моделі з пригніченим синтезом сірководню, був подібний до такого при старінні.

3. Вперше показано, що сірководень регулює процеси акумуляції кальцію в мітохондріях серця щурів: за дії NaHS у концентраціях (10^{-6} і 10^{-7} моль/л) помірно підвищувався вхід Ca^{2+} в органели, тоді як у високій концентрації NaHS (10^{-4} моль/л) частково пригнічувалася акумуляція катіона. Пригнічення синтезу H_2S вірогідно знижувало акумулюючу і, ймовірно, кальцієву ємність мітохондрій. Мітохондрії серця старих тварин більш чутливі до високих концентрацій кальцію, процес накопичення іона був інтенсивнішим в часі зібільшенням на 33 %.
4. Пригнічення ендогенного утворення H_2S *in vivo* знижувало чутливість МП до Ca^{2+} та підвищувало амплітуду набухання мітохондрій серця дорослих щурів *in vitro*. Дія інгібітора 3-MPST на органели старих тварин була більш вираженою.
5. Пригнічення мітохондріального ферменту синтезу сірководню *in vivo* знижувало функціональну активність електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, яка проявлялась у зменшенні швидкості споживання кисню у станах V_2 , V_3 та V_4 , а також показників дихального контролю та АДФ/О за Чансом, що може свідчити про порушення енергетичного забезпечення міокарда.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hosoki R, Matsuki N and Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 237(3):527-531.
2. Sun W-H, Liu F, Chen Y and Zhu Y-C, Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. *Biochem and Biophys Res Commun.* 2012; 421(2):164-169.
3. Shen Y, Shen Z, Shanshan Luo, Wei Guo, and Yi Zhun Zhu. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. *Ox Med and Cell Long.* 2014:1-14.
4. Strutynska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulfide inhibits Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. *Fiziol Zh.* 2011; 57(6):3-14. [Ukrainian].
5. Munaron L, Avanzato D, Moccia F, Mancardi D. Hydrogen sulfide as a regulator of calcium channels. *Cell Calcium.* 2013; 53:77-84.
6. Singh S, Banerjee R. PLP-dependent H₂S biogenesis *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011; 1814:1518-1527.
7. Kuo MM, Kim DH, Jandu S, Bergman Y. Tan S, Wang H, Pandey DR, Abraham TP, Shoukas AA, Berkowitz DE, Santhanam L. MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016; 310:H71-9.
8. Szabo C, Ransy C, Módis K, Andriamihaja M, Murghes B, Coletta C, Olah G, Yanagi K and Bouillaud F. Regulation of mitochondrial bioenergetics function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *British J of Pharm.* 2014; 171:2099-2122.

9. Glancy B, Balaban RS. Role of Mitochondrial Ca^{2+} in the Regulation of Cellular Energetics. *Biochemistry*. 2012; 51:2959-73.
10. Hunter DR, Haworth RA. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 1979; 195:453-9.
11. Luchkova AY, Strutynska NA, Sagach VF. The influence of calcium accumulation on the function of electron transport chain in the old rat heart mitochondria. *Fiziol Zh*. 2018; 64(5):16-25. [Ukrainian].
12. Sagach VF, Vavilova GL, Strutyns'ka NA, Rudyk OV. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening to inductors in rat heart. *Fiziol Zh*. 2004; 50 (2):49-63. [Ukrainian].
13. Wehrens X, Marks AR. Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. *Drug Discovery*. 2004; 3:1-9.
14. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamas K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res*. 2017; 121:181-195.
15. Choi E, Cha M-J, Hwang K-C. Roles of Calcium Regulating MicroRNAs in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells*. 2014; 3:899-913.
16. Marks AR. Calcium and the heart: a question of life and death. *J. Clin Invest*. 2003; 111:597-600.
17. Dedkova EN, Blatter LA. Calcium signaling in cardiac mitochondria. *J Mol and Cell Cardiol*. 2013; 58:125-33.
18. Giorgi C, Agnoletto Ch, Bononi A, et al. Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion*. 2012; 77-85.
19. Garlid KD, Costa AD, Quinlan CL, Pierre SV, Santos PD. Cardioprotective Signaling to Mitochondria. *J Mol Cell Cardiol*. 2009; 46:858 – 866.
20. Brown DA, Perry JB, Allen ME et al. Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*. 2017; 14:238-250.

21. Frasier ChR. The role of cardiac mitochondria in myocardial ischemia/reperfusion injury: a dissertation In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree PhD. 2012; 182.
22. Szabadkai G, Duchen MR. Mitochondria: The Hub of Cellular Ca²⁺ signaling. *Physiology*. 2008; 23:84-94.
23. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliansky V, Mootha VK. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011; 476(7360):341-5.
24. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011; 476(7360):336-40.
25. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13(9):566-78.
26. Billups B, Forsythe ID. Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *J Neurosci*. 2002; 22(14):5840-7.
27. Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*. 2000; 529 Pt 1:57-68.
28. Rutter GA, McCormack JG, Midgley PJ, Denton RM. The role of Ca²⁺ in the hormonal regulation of the activities of pyruvate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase complexes. *Ann N Y Acad Sci*. 1989; 573:206-17.
29. Tarasov AI, Griffiths EJ, Rutter GA. Regulation of ATP production by mitochondrial Ca²⁺. *Cell Calcium*. 2012.
30. Denton RM. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1787(11):1309-16.

31. Boerries M, Most P, Gledhill JR, Walker JE, Katus HA, Koch WJ et al. Ca^{2+} - dependent interaction of S100A1 with F1-ATPase leads to an increased ATP content in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(12):4365-73.
32. Das AM. Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Mol Genet Metab.* 2003; 79(2):71-82.
33. Wernette ME, Ochs RS, Lardy HA. Ca^{2+} stimulation of rat liver mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1981; 256(24):12767-71.
34. Kirichenko AV, Pfitzner U, Ludwig B, Soares CM, Vygodina TV, Konstantinov AA. Cytochrome c oxidase as a calcium binding protein. Studies on the role of a conserved aspartate in helices XI-XII cytoplasmic loop in cation binding. *Biochemistry.* 2005; 44(37):12391-401.
35. Palmieri L, Pardo B, Lasorsa FM, Del Arco A, Kobayashi K, Iijima M et al. Citrin and aralar1 are Ca^{2+} -stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J.* 2001; 20(18):5060-9.
36. Mishra J, Jhun BS, Hurst S, O-Uchi J, Csordás G, and Sheu S. The Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter: Structure, Function and Pharmacology. *Handb Exp Pharmacol.* 2017; 240: 129-56.
37. Bondarenko AI, Jean-Quartier C, Parichatikanond W, Rizwan Alam M, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF. Mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU)-dependent and MCU-independent Ca^{2+} channels coexist in the inner mitochondrial membrane. *Eur J Physiol.* 2014; 466:1411-20.
38. Raffaello A, De Stefani D, Sabbadin D, Teardo E, Merli G, Picard A, Checchetto V, Moro S, Szabo I, Rizzuto R. The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *The EMBO journal.* 2013; 32:2362-2376
39. Csordas G, Golenar T, Seifert EL, Kamer KJ, Sancak Y, Perocchi F, Moffat C, Weaver D, de la Fuente Perez S, Bogorad R, Koteliansky V, Adjianto J, Mootha VK,

- Hajnoczky G. Micu1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter. *Cell metabolism*. 2013; 17:976-987.
- 40.Sancak Y, Markhard AL, Kitami T, Kovacs-Bogdan E, Kamer KJ, Udeshi ND, Carr SA, Chaudhuri D, Clapham DE, Li AA, Calvo SE, Goldberger O, Mootha VK. Emre is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science*. 2013; 342:1379-1382.
- 41.Michels G, Khan IF, Endres-Becker J, Rottlaender D, Herzig S, Ruhparwar A, Wahlers T, Hoppe UC. Regulation of the human cardiac mitochondrial Ca^{2+} uptake by 2 different voltage-gated Ca^{2+} channels. *Circulation*. 2009; 119:2435-2443.
- 42.Bogeski I, Gulaboski R, Kappl R, Mirceski V, Stefova M, Petreska J, Hoth M. Calcium binding and transport by coenzyme q. *Journal of the American Chemical Society*. 2011; 133:9293-9303.
- 43.Jiang D, Zhao L, Clapham DE. Genome-wide RNAi screen identifies letm1 as a mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter. *Science*. 2009; 326:144-147.
- 44.Tsai MF, Jiang D, Zhao L, Clapham D, Miller C. Functional reconstitution of the mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter letm1. *The Journal of general physiology*. 2014; 143:67-73.
- 45.Feng S, Li H, Tai Y, Huang J, Su Y, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L, Wang Y. Canonical transient receptor potential 3 channels regulate mitochondrial calcium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110:11011-11016.
- 46.Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol and Cell Card*. 2015; 78:100-6.
- 47.Brenner C, Moulin M. Physiological Roles of the Permeability Transition Pore. *Circ Res*. 2012; 111:1237-47.

48. Morin D, Assaly R, Paradis S, Berdeaux A. Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection. *Curr Med Chem.* 2009; 33(16):4382-98.
49. Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1366:33-50.
50. Akopova OV. The role of mitochondrial permeability transition pore in the mitochondrial intermembrane calcium transition. *Ukr Biochem J.* 2008; 80(3):40-8.
51. Baines ChP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2009; 104:181-8.
52. Hurst S, Hoek J, Sheu S-S. Mitochondrial Ca^{2+} and Regulation of the Permeability Transition Pore. *Bioenerg Biomembr.* 2017; 49(1):27-47.
53. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004; 61(3):372-85.
54. Kwong JQ, Molkenin JD. Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. *Cell Metabolism.* 2015; 21:206-14.
55. Szabó I, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules: I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Letters.* 1993; 330(2):201-205.
56. Haworth RA, Hunter DR. Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000; 32:91-96.
57. Baines ChP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol and Cell Card.* 2009; 46:850-7.

58. Leung AWC, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem.* 2008; 283:26312-23.
59. Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, et al. Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem.* 2009; 284:33982-8.
60. Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Physiol Rev.* 2015; 95:1111-55.
61. Shanmughapriya S, Rajan S, Hoffman NE, et al. SPG7 Is an Essential and Conserved Component of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol Cell.* 2015; 1-41.
62. Allen DG, Lee JA, and Smith GL. The consequences of simulated ischaemia on intracellular Ca²⁺ and tension in isolated ferret ventricular muscle. *J Physiol.* 1989; 410: 297-323.
63. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. *Cardiovascular Res.* 2005; 66:222-32.
64. Ziegler DV, Wiley CD, Velarde MC. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell.* 2015; 14:1-7.
65. Cui H, Kong Y, and Zhang H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *J of Signal Transd.* 2012; 1-14.
66. Dai D, Rabinovitch PS, Ungvari Z, Sinclair D, North B. Mitochondria and Cardiovascular Aging. *Circul Res.* 2012; 110(8):1109-25.
67. Long Q, Yang K, and Yang Q. Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. *Am J Cardiovasc Dis.* 2015; 5(1):19-32.

68. Kajimura M, Fukuda R, Bateman RM, Yamamoto T, Suematsu M. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010; 13(2):157-92.
69. Chad K. Nicholson and John W. Calvert Hydrogen Sulfide and Ischemia - Reperfusion Injury *Pharmacol Res*. 2010; 62(4): 289-297.
70. Bridgette F Moody and John W Calvert Emergent role of gasotransmitters in ischemia-reperfusion injury *Medical Gas Research* 2011; 1-3.
71. Wang R. The Gasotransmitter Role of Hydrogen Sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2003; 5(4): 493-502.
72. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci*. 1996; 16:1066-71.
73. Lavu M, Bhushan S, Lefer DJ. Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*. 2011; 120:219-29.
74. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*. 2012; 92(2):791-896.
75. Liu Y-H, Lu M, Hu Li-F, Wong P, Webb GD, Bian JS. Hydrogen Sulfide in the Mammalian Cardiovascular System. *Antiox and redox signal*. 2012; 17(1):141-86.
76. Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Drug Discovery*. 2007; 6: 917-35.
77. Guo W, Kan J, Cheng Z, Chen J, Shen Y, Xu J, Wu D, Zhu Y. Hydrogen Sulfide as an Endogenous Modulator in Mitochondria and Mitochondria Dysfunction. *Ox Med and Cell Long*. 2012; 1-9.
78. Mikami Y, Kimura H. A mechanism of retinal protection from light-induced degeneration by hydrogen sulfide. *Commun. Integr. Biol*. 2012; 5:1-3.
79. Hildebrandt TM, Grieshaber MK. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS. J*. 2008; 275:3352-61.

80. Kimura H. Metabolic turnover of hydrogen sulfide. *Frontiers in Physiology*. 2012; 3(101):1-3.
81. Lefer DJ. A new gaseous signaling molecule emerges. Cardioprotective role of hydrogen sulfide. *PNAS*. 2007; 104(46):17907-8.
82. Zhou X, Lu X. Hydrogen sulfide inhibits high-glucose induced apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Experimental Biology and Medicine*. 2013; 238(4):370-4.
83. Yao L-L, Huang X-W, Wang Y-G, Cao Y-X, Zhang C-C, Zhu YC. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing GSK-3 β -dependent opening of mPTP. *Am J of Physiol – Heart and Circ Physiol*. 2010; 298(5):H1310-9.
84. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J. et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2007; 104(39):15560-5.
85. Zanardo RCO, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *The FASEB Journal*. 2006; 20(12):2118-20.
86. Szabo C, Papapetropoulos A. Hydrogen sulphide and angiogenesis: mechanisms and applications. *British J of Pharmac*. 2011; 164(3):853-65.
87. King AL, Polhemus DJ, Bhushan S et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase nitric oxide dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2014; 111(8):3182-7.
88. Kondo K, Bhushan S, King AL. et al, H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2013; 127(10):1116-27.
89. Predmore BL, Kondo K, Bhushan S et al. The polysulfide diallyltrisulfide protects the ischemic myocardium by preservation of endogenous hydrogen sulfide and

- increasing nitric oxide bioavailability. *The Am J of Physiol — Heart and Circ Physiol.* 2012; 302(11):H2410-18.
90. Tao BB, Liu SY, Zhang CC, Fu W. et al. VEGFR2 functions as an H₂S-targeting receptor protein kinase with its novel Cys1045-Cys1024 disulfide bond serving as a specific molecular switch for hydrogen sulfide actions in vascular endothelial cells. *Antioxid & redox sign.* 2013; 19:448-64.
91. Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, Jeschke MG, Branski LK, Herndon DN, Wang R, Szabo C. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009; 106:21972-7.
92. Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, Muellner MK, Exner M, Gmeiner BM, Kapiotis S. The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. *J of hypertension.* 2007; 25:2100-4.
93. Zong Y, Huang Y, Chen S, Zhu M, Chen Q, Feng S, Sun Y, Zhang Q, Tang C, Du J, Jin H. Downregulation of Endogenous Hydrogen Sulfide Pathway Is Involved in Mitochondrion-Related Endothelial Cell Apoptosis Induced by High Salt. *Ox med and cell long.* 2015:1-12.
94. Yang G, Li H, Tang G, Wu L, Zhao K, Cao Q, Xu C, Wang R. Increased neointimal formation in cystathionine gamma-lyase deficient mice: role of hydrogen sulfide in alpha5beta1-integrin and matrix metalloproteinase-2 expression in smooth muscle cells. *J of mol and cell card.* 2012; 52:677-88.
95. Yang G, Wu L, Wang R. Pro-apoptotic effect of endogenous H₂S on human aorta smooth muscle cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2006; 20:553-5.
96. Sun YG, Cao YX, Wang WW, Ma SF, Yao T, Zhu YC. Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovascular research.* 2008; 79:632-41.

97. Zhang Z, Huang H, Liu P, Tang C, Wang J. Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening K ATP channels. *Canadian J of physiology and pharmacology*. 2007; 85:1248-53.
98. Shi S, Li QS, Li H, Zhang L, Xu M, Cheng JL, Peng CH, Xu CQ, Tian Y. Anti-apoptotic action of hydrogen sulfide is associated with early JNK inhibition. *Cell biology international*. 2009; 33:1095-1101.
99. Ge SN, Zhao MM, Wu DD, Chen Y, et al. Hydrogen sulfide targets EGFR Cys797/Cys798 residues to induce Na(+)/K(+)-ATPase endocytosis and inhibition in renal tubular epithelial cells and increase sodium excretion in chronic salt-loaded rats. *Antiox & redox sign*. 2014; 21:2061-82.
100. Paul BD, Snyder SH. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2012; 13:499-507.
101. Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. H₂S signals through protein S-sulfhydration, *Science signaling*. 2009; 2(96).
102. Hara MR, Agrawal N, Kim SF et al. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature cell biology*. 2005; 7:665-74.
103. Greiner R, Palinkas Z, Basell K, Becher D, Antelmann H, Nagy P, Dick TP. Polysulfides link H₂S to protein thiol oxidation. *Antioxidants & redox signaling*. 2013; 19:1749-65.
104. Collman JP, Ghosh S, Dey A, Decreau RA. Using a functional enzyme model to understand the chemistry behind hydrogen sulfide induced hibernation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2009; 106:22090-5.
105. Vacek TP, Gillespie W, Tyagi N, Vacek JC, Tyagi SC. Hydrogen sulfide protects against vascular remodeling from endothelial damage. *Amino acids*. 2010; 39:1161-9.

106. Givvimani S, Munjal C, Gargoum R, Sen U, Tyagi N, Vacek JC, Tyagi SC. Hydrogen sulfide mitigates transition from compensatory hypertrophy to heart failure. *J Appl Physiol*. 2011; 110:1093-1100.
107. Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2011; 51:169-87.
108. Pan LL, Liu XH, Gong QH, Wu D, Zhu YZ. Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells. *PloS one*. 2011; 6.
109. Tao BB, Zhang CC, Liu SY, Zhu YC. Involvement of HIF-1 in the migration-promoting effects of hydrogen sulfide in vascular endothelial cells under normoxic conditions. *Acta physiologica Sinica*. 2012; 64:129-34.
110. Zhou X, Zhao L, Mao J, Huang J, Chen J. Antioxidant effects of hydrogen sulfide on left ventricular remodeling in smoking rats are mediated via PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2015 144; 197-203.
111. Kimura H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000; 267:129-33.
112. Johansen D, Ytrehus K, Baxter GF. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury--Evidence for a role of K_{ATP} channels. *Basic research in cardiology*. 2006; 101:53-60.
113. Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, Andersson DA, Jordt SE, Bevan S, Andersson KE, Hogestatt ED, Zygmunt PM. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *European urology*. 2008; 53; 391-9.
114. Liu Y, Yang R, Liu X, Zhou Y, Qu C, Kikui T, Wang S, Zandi E, Du J, Ambudkar IS, Shi S. Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function

- and bone homeostasis via regulation of Ca²⁺ channel sulfhydration. *Cell stem cell*. 2014; 15: 66-78.
115. Fu M, Zhang W, Wu L, Yang G, Li H. and Wang R. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109(8):2943-8.
116. Kimura Y, Goto YI, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2010; 12(1):1-13.
117. Takimoto E, Champion HC, Belardietal D. cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism. *Circulation Research*. 2005; 96(1):100-9.
118. Xu L, Eu JP, Meissner G. and Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (Ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*. 1998; 279(5348):234-7.
119. Nagpure BV and Bian J-S. Interaction of Hydrogen Sulfide with Nitric Oxide in the Cardiovascular System. *Ox Med and Cell Longev*. 2016; 16 pages.
120. Pan T-T, Feng Z-N, Lee SW, Moore PK and J-S Bian. Endogenous hydrogen sulfide contributes to the cardioprotection by metabolic inhibition preconditioning in therat ventricular myocytes. *J of Mol and Cell Card*. 2006; 40(1):119-30.
121. Sojitra B, Bulani Y, Putcha UK et al. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice. *Mol and Cell Biochem*. 2012; 360(1-2):61-9.
122. Yong QC, Lee SW, Foo CS, Neo KL, Chen X. and Bian J-S. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *The American Ox Med and Cell Long – J of Physiol – Heart and Circ Physiol*. 2008; 295(3):H1330-40.

123. Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, Nishikawa H and Kawa-bata A. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vasculartension. *Toxicology*. 2007; 232(1-2):138-46.
124. Geng B, Cui Y, Zhao J et al. Hydrogen sulfide downregulates the aortic L-arginine/nitric oxide pathway in rats. *The Am J of Physiol – Regul Integrat and Comp Physiol*. 2007; 293(4):R1608-18.
125. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; (1):265-75.
126. Kolomiets OV, Danylovyh YuV, Danylovyh GV, Kosterin SO. Ca^{2+} accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. *Ukr Biochem J*. 2013; 85(4):30-9 [Ukrainian].
127. Brand MD, Brown GC, Cooper CE, Editors, *Bioenergetics: a practical approach*. Oxford.: IRL Press. 1995; 39-62.
128. Borutaite V, Mildaziene V, Brown GC, Brand MD. Control and kinetic analysis of ischemia-damaged heart mitochondria: which parts of the oxidative phosphorylation system are affected by ischemia? *Biochim and Biophys Acta*. 1995; (1272):154-8.
129. Doring HJ. The isolated perfused heart according to Langendorff technique—function application. *Physiol Bohemoslov*. 1990; 39(6):481-504.
130. Chance B, Williams GR. *Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation*. University of Pennsylvania. 1955; 429-39.
131. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. *Anal Biochem*. 1980; 107(1): 51-5.
132. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca^{2+} dependent and Ca^{2+} independent nitric oxide syntases. *FEBS Lett*. 1991; 291(1):145-9.

133. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ, Kobori H. et al. Increased activity and expression of Ca²⁺ dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Amer J Physiol.* 1999; 277(5):797-804.
134. Boyde JR, Rahmotullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem.* 1980; 107:424-31.
135. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982; 60(11):1346-52.
136. Forman H. J. Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. *Arch Biochem Biophys.* 1973; 158(1):396-400.
137. Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge JM. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods Biochem Anal.* 1988; 33:59-90.
138. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. *Lab Delo.* 1988; 2: 60-4.
139. Conte D, Narindrasorasa KS, Sarkar B. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. *Eur J Biochem.* 1996; 271(9):5125-30.
140. Shymans'ka TV, Hoshovs'ka IuV, Semenikhina OM, Sahach VF. Effect of hydrogen sulfide on isolated rat heart reaction under volume load and ischemia-reperfusion]. *Fiziol Zh.* 2012; 58(6):57-66. [Ukrainian].
141. Shimanskaia TV, Strutinskaia NA, Vavilova GL, Goshovskaia IuV, Semenikhina EN, Sagach VF. Cyclosporin A-sensitive mitochondrial pore as a target of cardioprotective action of hydrogen sulfide donor. *Rus J of Physiol.* 2013 Feb; 99(2):261-72. [Russian].

142. Halestrap AP, Pasdois Ph. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim et Biophysica Acta*. 2009; 1787:1402-15.
143. Vassalle M, Lin Ch-I. Calcium Overload and Cardiac Function. *J Biomed Sci*. 2004; 11:542-565.
144. Strutynska NA, Kotsiuruba AV, Budko AYu, Mys LA, Sagach VF. Mitochondrial dysfunction in the aging heart is accompanied by constitutive NO-synthases uncoupling on the background of oxidative and nitrosative stress. *Fiziol Zh*. 2016; 62(2):3-11.
145. Luchkova AY, Strutynska NA, Korkach YP, Sagach VF. Inhibition of mitochondrial H₂S synthesis increases oxidative stress and impairs the electron transport chain function. *Fiziol Zh*. 2018; 64(6):9-16 [Ukrainian].
146. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *AJP-Cell Physiol*. 2004; 287:817-33.
147. Kolomiets OV, Danylovyh YuV, Danylovyh GV, Kosterin SO. Ca²⁺ accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. *Ukr Biochem J*. 2013; 85(4):30-9 [Ukrainian].
148. Zalessky VN. Molecular diagnostics: laser-scanning and flow cytometry in the analysis of apoptosis. *Ukr Med Chasopys*. 2010; 78(4):27-31 [Ukrainian].
149. Babich LG, Shlykov SG, Naumova NV, Kosterin SO. Investigation of Ca²⁺-induced changes of membrane potential of smooth muscle mitochondria using flow cytometric analysis. *Ukr Biochem J*. 2007; 79(6):34-41 [Ukrainian].
150. Budko AYu, Strutynska NA, Okhay YY, Semenykhina OM, Sagach VF. Ca²⁺ Accumulation in Isolated Rat Heart Mitochondria under Maintenance of Mitochondrial Membrane Potential. *Fiziol J* 2015; 61(6): 17-25 [Ukrainian].
151. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. *Cardiovascular Res*. 2005; 66:222-32.

152. Ziegler DV, Wiley CD, Velarde MC. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell*. 2015; 14:1-7.
153. Duicu OM, Mirica SN, Gheorgheosu DE, Privistirescu AI, Fira-Mladinescu O, Muntean DM. Ageing-induced decrease in cardiac mitochondrial function in healthy rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013; 91:1-8.
154. Dong Z, Shanmughapriya S, Tomar D, Rajan S, Stathopoulos PB, Madesh M. Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Is a Mitochondrial Luminal Redox Sensor that Augments MCU Channel Activity. *Mol Cell*. 2017; 65:1014-28.
155. Luchkova AY, Strutynska NA, Sagach VF. Hydrogen sulfide increases calcium accumulation in cardiac mitochondria and prevents cyclosporine A-sensitive mitochondrial pore in rat heart. *Fiziol. Zh.* 2017; 63(3): 9-15 [Ukrainian].
156. Pan TT, Neo KL, Hu LF, Yong QC, Bian JS. H₂S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes. *The Am J of Physiol – Cell Physiol*. 2008; 294(1):169-77.
157. Mys LA, Budko AYu, Strutynska NA, Sagach VF. Pyridoxal-5-phosphate restores hydrogen sulfide synthesis and redox state of heart and blood vessels tissue in old animals. *Fiziol zh.* 2017; 63(1):3-9.
158. Sorgato MC, Keller BU, Stuhmer W. Patch-clamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel. *Nature*. 1987; 330:498-500.
159. Szabo I, Zoratti M. The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin. *A. J Biol Chem*. 1991; 266:3376-9.
160. Wang R. Hydrogen sulfide: a new EDRF. *Kidney Int*. 2009; 76(7):700-4.
161. Wang YF, Mainali P, Tang CS et al. Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chin Med J*. 2008; 121:420-3

162. Yong Q-C, Hu L-F, Wang S. et al. Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxyl. *Cardiovascular Research*. 2010; 88(3):482-91.
163. Filipovic MR, Miljkovic J, Allgauer A. et al. Biochemical insight into physiological effects of H₂S: reaction with peroxynitrite and formation of a new nitric oxide donor, sulfinyl nitrite. *Biochem J*. 2012; 441:609-21.
164. Lesnefsky EJ, Hoppel CL. Oxidative phosphorylation and aging. *Age Res Rev*. 2006:402-33.
165. Lukyanova LD. Mitochondria signaling in adaptation to hypoxia. *Fiziol Zh*. 2013; 59(6): 141-54.
166. Luchkova AYu, Hoshovska YuV, Fedichkina RA, Strutynska NA, Sagach V.F. Inhibition of mitochondrial H₂S synthesis depresses heart function and increases sensitivity of mitochondria to calcium load. *Fiziol Zh*. 2017; 63(4):3-9 [Ukrainian].
167. Zhao WM, Zhang J, Lu YJ and Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *The EMBO Journal*. 2001; 20(21):6008-16.
168. Sodha NR, Clements RT, Feng J et al. Hydrogen sulphide therapy attenuates the inflammatory response in a porcine model of myocardial ischemia/ reperfusion injury. *The J of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2009; 138(4):977-84.
169. Kai S, Tanaka T, Daijo H et al. Hydrogen sulfide inhibits hypoxia-but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von hippel-lindau and mitochondria-dependent manner. *Antiox and Redox Sign*. 2012; 16(3):203-16.
170. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007; 6(11):917-35.
171. Calvert J.W, Coetzee WA and Lefter DJ. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. *Antiox & Redox Sign*. 2010; 12(10):1203-17.

172. Murphy B, Bhattacharya R, Mukherjee P. Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. *FASEBJ*. 2019; 33: 13098-125.
173. Kashfi K. The role of hydrogen sulfide in health and disease. *Biochemical Pharmacology*. 2018; 149:1-4.
174. Szabo C. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017; 312:C3-C15.
175. Akopova OV, Sagach VF. The influence of NO donors on Ca²⁺ accumulation in rat heart and liver mitochondria. *Ukr Biochem J*. 2005; 77(2):82-7.
176. Semenykhina OM, Strutynska NA, Budko AY, Vavilova GL, Sagach VF. Effect of hydrogen sulfide donor NaHS on the functional state of the respiratory chain of rat heart mitochondria. 2013; 59(2):9-17.

ДОДАТОК 1.**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ, В ЯКИХ
ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:**

7. **Будько А.Ю.**, Струтинська Н.А., Охай І.Ю., Семенихіна О.М., Сагач В.Ф. Накопичення Ca^{2+} у мітохондріях серця щурів за умов підтримання мітохондріального потенціалу. Фізіол. журн. 2015; 61(6): 17-25.
8. Струтинська Н.А., Коцюрuba А.В., **Будько А.Ю.**, Мись Л.А., Сагач В.Ф. Порушення функціонування мітохондрій у серці при старінні супроводжується неспряженням конститутивних NO-синтаз на тлі оксидативного та нітрозативного стресу. Фізіол. журн. 2016; 62(2): 3-11.
9. **Лучкова А.Ю.**, Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Сірководень підвищує акумуляцію кальцію в мітохондріях та пригнічує відкривання циклоспорин А-чутливої мітохондріальної пори в серці щурів. Фізіол. журн. 2017; 63(3): 9-15.
10. **Лучкова А.Ю.**, Гошовська Ю.В., Федічкіна Р.А., Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Пригнічення мітохондріального шляху синтезу сірководню погіршує скоротливу функцію серця та підвищує чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у серці щурів. Фізіол. журн. 2017; 63(4): 3-9.
11. **Лучкова А.Ю.**, Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Вплив іонів кальцію на дихальний ланцюг мітохондрій у серці старих щурів. Фізіол. журн. 2018; 64(5):16-25.
12. **Лучкова А.Ю.**, Струтинська Н.А., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Інгібування мітохондріального синтезу сірководню посилює окисний стрес та погіршує роботу електронно-транспортного ланцюга. Фізіол. журн. 2018; 64(6):9-16.

ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

8. Semenykhina O, Strutynska N., Chorna S., **Budko A.**, Dosenko V., Sagach V. NO-dependent prevention of mitochondrial permeability transition pore opening by hydrogen sulfide in old rat heart. FEBS J., 281 (Suppl. 1): 359 (2014).
9. **Alina Budko**, N.A. Strutynska, L.A. Mys, O.M. Semenykhina, V.F. Sagach Hydrogen sulfide (H₂S) regulates mitochondrial Ca²⁺ accumulation and prevents permeability transition pore opening in adult rat hearts. Conference for Young Scientists CYS-2015, September 21-25, Kyiv, Ukraine, Abstract book, p. 162.
10. **Budko AYu**, Strutynska NA, Mys LA, Sagach VF. NO-dependent prevention of permeability transition pore (MPTP) opening by H₂S and its regulation of Ca²⁺ accumulation in adult rat heart mitochondria. Cardiovascular Research Supplements. 2016; 111: S56-S81., Frontiers in cardiovascular biology, Florence, Italy, 08-10 July 2016.
11. **Лучкова А.Ю.**, Гошовська Ю.В., Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Інгібування мітохондріального шляху синтезу сірководню погіршує скоротливу функцію серця та підвищує чутливість мітохондріальної пори до Ca²⁺ у серці щурів. Бюлетень XVI читань ім. В.В. Підвисоцького, 18 – 19 травня 2017 року.
12. **A.Y. Luchkova**, L.A. Mys, Y.V. Goshovska, N.A. Strutynska, V.F. Sagach The role of mitochondrial origin H₂S in mitochondrial permeability transition pore opening and cardiac resistance to Ca²⁺ overload in rats. 42-nd FEBS Congress from Molecules to Cells and Back. 10-14 September, 2017, Jerusalem, Israel

13. **Luchkova A.Yu.**, Strutynska N.A., Sagach V.F. Hydrogen sulfide (H₂S) regulates mitochondrial function, Ca²⁺ accumulation and mitochondrial permeability transition pore opening in old rat heart. *European Heart Journal* 39(suppl_1), August 2018. 25-29 August, 2018, Munich, Germany.
14. **Luchkova A**, Strutynska N, Sagach V. Hydrogen sulfide modulates calcium handling in cardiac mitochondria to maintain their function and helps heart to resist calcium overload. *European Journal of Heart Failure*, 21 (Suppl. S1), P. 577 *Heart Failure 2019 & World Congress on Acute Heart Failure*, Athens, Greece from 25 – 28 May 2019.